

# Die Interaktion von Galektin-8 mit Cateninen und der Einfluss auf den Wnt-Signalweg in Lungen- und Pankreaskarzinomzelllinien

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Zmyslony, Amanda Paulina  
aus Stuttgart

Gießen 2018

Aus der Klinik für Innere Medizin,  
unter der Leitung von Prof. Dr. Andre Menke,  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter: Prof. Dr. Andre Menke
2. Gutachter: PD Dr. Sebastian Galuska

Tag der Disputation: 25.03.2019

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Das Bronchialkarzinom .....	1
1.2 Das Pankreaskarzinom .....	1
1.3 Metastasierung .....	3
1.4 Zell-Zell-Kontakte .....	3
1.5 Catenine .....	4
1.6 Catenin-abhängiger Wnt-Signalweg .....	5
1.7 Galektine .....	7
1.7.1 Galektin-3 .....	9
1.7.2 Galektin-8 .....	9
1.7.3 Galektine in Tumoren .....	10
1.8 Zielsetzung dieser Arbeit .....	12
<b>2. Material .....</b>	<b>13</b>
2.1 Chemikalien .....	13
2.2 Verbrauchsmaterialien .....	13
2.3 Enzyme und molekularbiologische <i>Kits</i> .....	13
2.4 Primäre Antikörper .....	14
2.5 Sekundäre Antikörper .....	15
2.5.1 Sekundäre Antikörper für Western-Blot .....	16
2.5.2 Sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenz .....	17
2.6 Molekulargewichtsmarker .....	17
2.6.1 Marker für die Agarose-Gelelektrophorese .....	17
2.6.2 Marker für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	17
2.7 Rekombinante Proteine .....	17
2.8 Transfektionsreagenzien .....	18
2.9 Expressionsvektoren .....	18
2.10 Prokaryotische Zellstämme .....	18
2.11 Eukaryotische Zelllinien .....	18
2.12 Geräte .....	19
2.13 Software .....	20
<b>3. Methoden .....</b>	<b>21</b>

3.1 Molekularbiologische Methoden .....	21
3.1.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen .....	21
3.1.2 Passagieren von Zellen .....	21
3.1.3 Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-Zählkammer .....	22
3.1.4 Transiente Transfektion von HEK-293-Zellen mit PEI .....	22
3.1.5 Transiente Transfektion von Panc-1-Zellen mit DMRIE-C .....	23
3.1.6 Transiente Transfektion von H1299-Zellen mit Lipofectamine 2000 .....	23
3.1.7 Herstellung von Zelllysaten .....	24
3.1.8 Membran-Cytosol-Präparation .....	25
3.1.9 Proteinbestimmung .....	26
3.1.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	27
3.1.11 Coomassie-Färbung .....	28
3.1.12 Western-Blot .....	29
3.1.13 Ponceau-S-Färbung .....	29
3.1.14 Proteinnachweis durch spezifische Antikörper .....	30
3.1.15 Entfernung gebundener Antikörper von der Nitrocellulosemembran .....	31
3.1.16 Immunpräzipitation .....	31
3.1.16.1 Immunpräzipitation mit Agarose <i>Beads</i> .....	32
3.1.16.2 Immunpräzipitation mit $\mu$ MACS <i>Beads</i> .....	33
3.1.17 Immunhistochemische Färbungen .....	35
3.1.18 Luziferase-Assay .....	36
3.1.19 Statistik .....	37
3.2 Mikrobiologische Methoden .....	37
3.2.1 Transformation .....	37
3.2.2 Animpfen der Bakterienklone .....	38
3.2.3 Isolierung der Plasmid-DNA .....	38
3.2.4 DNA-Verdau .....	38
3.2.5 Agarose-Gelelektrophorese .....	39
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>40</b>
4.1 Analyse der Expression von Cateninen und Galektinen in verschiedenen Lungen- und Pankreaskarzinomzelllinien .....	40



4.2 Lokalisationsanalyse von Cateninen und Galektinen .....	43
4.3 Analyse der Interaktion von Cateninen und Galektinen durch Immunpräzipitation .....	47
4.3.1 Präzipitation von Galektinen mit Hilfe eines GFP- <i>Tags</i> .....	47
4.3.2 Präzipitation von Galektinen ohne GFP- <i>Tag</i> .....	49
4.3.3 Präzipitation von $\beta$ -Catenin .....	54
4.3.4 Präzipitation von $\gamma$ -Catenin .....	57
4.4 Lokalisationsanalyse der Interaktion von Galektinen und Cateninen nach Zellfraktionierung.....	59
4.5 Luziferase-Assay .....	62
4.5.1 Wnt-Reporterassays.....	62
4.5.2 SRE-Reporterassays.....	67
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>69</b>
5.1 Expression von Cateninen und Galektinen in verschiedenen Lungen- und Pankreaskarzinomzelllinien .....	69
5.2 Lokalisation von Cateninen und Galektinen in der Zelle.....	70
5.3 Interaktion von $\beta$ -Catenin mit Galektinen .....	71
5.4 Interaktion von $\gamma$ -Catenin mit Galektinen.....	76
5.5 Lokalisation der Interaktion von Cateninen und Galektinen .....	76
5.6 Einfluss der Interaktion von Cateninen und Galektinen auf die Genregulation ..	77
5.7 Ausblick .....	79
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>80</b>
<b>7. Abstract .....</b>	<b>81</b>
<b>8. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>82</b>
<b>9. Konferenzbeitrag.....</b>	<b>87</b>
<b>10. Ehrenwörtliche Erklärung .....</b>	<b>88</b>
<b>11. Danksagung.....</b>	<b>89</b>

AG	Arbeitsgruppe
AK	Antikörper
Akt	Synonym für Proteinkinase B
ALK	<i>anaplastic lymphoma kinase</i>
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Axin	<i>axis inhibition protein</i>
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CFP	<i>cyan fluorescent protein</i>
CKI	Caseinkinase I
CMF	calcium- und magnesiumfrei
COX-2	Cyclooxygenase 2
CRD	<i>carbohydrate-recognition domain</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	1,4-Dithio-DL-threit(ol)
Dvl	<i>dishevelled</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECFP	<i>enhanced cyan fluorescent protein</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>

FAMMM-Syndrom	familiäres atypisches multiples Muttermal- und Melanom-Syndrom
Fz	<i>frizzled</i>
g	Erdbeschleunigung 9,81m/s <sup>2</sup>
G	Gauge
Gal-3	Galektin-3
Gal-8	Galektin-8
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
G-Protein	Guanosinnukleotid-bindendes Protein
GSK-3 $\beta$	Glycogen Synthasekinase-3 $\beta$
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HNPCC	hereditäres nichtpolypöses kolorektales Karzinom
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB-Medium	Lysogeny-Broth-Medium
Lef	<i>Lymphoid enhancer factor</i>
LiCl	Lithiumchlorid
LPR	Lipoprotein Rezeptor-verwandtes Protein
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ M	Mikromolar
m	Milli-
M	molar (mol pro Liter)
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase

## Abkürzungsverzeichnis

---

MEK	MAPK/ERK-Kinase
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
M/V	Masse pro Volumen
nm	Nanometer
NP40	Nonidet P40
NSCLC	nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PD-L1	<i>programmed cell death ligand 1</i>
PD-1	<i>programmed cell death receptor 1</i>
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
Raf	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
rek.	rekombinant
rpm	<i>rounds per minute</i>
SCLC	kleinzelliges Bronchialkarzinom
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SRE	<i>serum response element</i>
SRF	<i>serum response factor</i>
TBS	Tris-gepufferte Saline
TBS-T	Tris-gepufferte Saline mit 10 % Tween 20
Tcf	T-Zell Faktor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u.	und
unspez.	unspezifisch
UV	ultraviolett
V	Volt
V/V	Volumen pro Volumen

## 1. Einleitung

### 1.1 Das Bronchialkarzinom

Das Bronchialkarzinom ist das am häufigsten zum Tode führende Karzinom weltweit (Siegel et al., 2016). Rauchen ist bei Männern zu 80 % und bei Frauen zu 50 % die Ursache der Entwicklung eines Bronchialkarzinoms und damit der Hauptrisikofaktor, der zur Entstehung eines Bronchialkarzinoms beiträgt (Jemal et al., 2011).

Das Bronchialkarzinom lässt sich in zwei Gruppen, in das nicht-kleinzellige (*non-small cell lung cancer*, NSCLC) und das kleinzellige (*small cell lung cancer*, SCLC) Bronchialkarzinom, einteilen. 85 % der Patienten mit Bronchialkarzinom leiden unter einem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom. Hierzu gehören unter anderem das Plattenepithelkarzinom, das Adenokarzinom und das großzellige Karzinom der Lunge (Hoffman et al., 2000; Xi & Chen, 2014). Die 5-Jahres-Überlebensrate eines nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms beträgt 21 % und die eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms nur 7 % (Miller et al., 2016).

Häufig sind Patienten mit Bronchialkarzinom bei Erstdiagnose in einem fortgeschrittenen, inoperablen Stadium und haben regionäre Metastasen oder Fernmetastasen. Viele Jahre war eine systemische Chemotherapie die einzige Therapieoption. In den letzten Jahren hat sich die Prognose für Patienten mit einer Leitmutation verbessert. Bei Patienten mit fortgeschrittenem NSCLC lassen sich häufig Mutationen des Gens des *epidermal growth factor receptor* (EGFR), Mutationen des *K-RAS*-Gens oder Translokationen des Gens der *anaplastic lymphoma kinase* (ALK) nachweisen. Durch gezielte Behandlung mit EGFR- oder ALK-Thyrosinkinase-Inhibitoren konnte die Ansprechbarkeit des Tumors auf die Therapie gesteigert und die tumorfreie Zeit verlängert werden (Gadgeel, 2013; Zago et al., 2016). Zudem hat die Immuntherapie mit *programmed cell death receptor 1* (PD-1) und *programmed cell death ligand 1* (PD-L1) Antikörpern bei Patienten mit einem hohen Expressionsniveau an PD-L1 einen großen Therapiefortschritt von Patienten mit NSCLC ermöglicht (Huang et al., 2018).

### 1.2 Das Pankreaskarzinom

Das Pankreas ist eine Drüse, welche aus einem endokrinen und einem exokrinen Anteil besteht. Die meisten Pankreaskarzinome befallen den exokrinen Anteil. Hierbei handelt es sich in 80-90 % der Fälle um ein duktales Adenokarzinom (Zhang et al.,

2016). Das Pankreaskarzinom ist die Karzinomerkrankung, die am vierthäufigsten zum Tode führt (Siegel et al., 2016). Es wird in den meisten Fällen erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert und Patienten haben eine 5-Jahres-Überlebensrate von nicht mehr als 6 %. Aufgrund fehlender Frühsymptome haben bereits 80 % der Patienten bei Diagnosestellung Metastasen und können nicht mehr kurativ, durch Resektion des Tumors, behandelt werden (Du et al., 2016).

5-10 % aller Patienten mit einem Pankreaskarzinom haben eine positive Familienanamnese. Somit besteht bei einem Teil der Patienten eine genetische Prädisposition. Es sind einige genetische Syndrome, wie das hereditäre Mammakarzinom, das Peutz-Jeghers-Syndrom, das FAMMM-Syndrom, die hereditäre Pankreatitis und das HNPCC-Syndrom, mit einem erhöhten Risiko der Entwicklung eines Pankreaskarzinoms assoziiert (Shi et al., 2009).

Das Protoonkogen *K-RAS* ist bei mehr als 90 % der Patienten mit einem Pankreaskarzinom durch eine Punktmutation aktiviert (Polireddy & Chen, 2016). K-Ras gehört zur Ras-Proteinfamilie und kommt in zwei verschiedenen Spleißvarianten, K-Ras4A und K-Ras4B, vor. K-Ras4B wird in der vorliegenden Arbeit als K-Ras bezeichnet, da K-Ras4A in humanen Zellen nur in sehr geringen Mengen exprimiert wird (Shimizu et al., 1983). Neben K-Ras existieren die Ras-Isoformen H-Ras und N-Ras. Ras-Proteine gehören zu den Guanosinnukleotid-bindenden Proteinen (G-Proteinen). Durch Bindung von GTP befinden sich Ras-Proteine in ihrem aktiven Konformationszustand und können Ras-abhängige Signalwege aktivieren. Es konnte gezeigt werden, dass Ras-Proteine mit Galektinen (Kapitel 1.5) interagieren. Galektin-1 bindet hauptsächlich H-Ras-GTP und Galektin-3 K-Ras-GTP (Elad-Sfadia et al., 2004; Paz et al., 2001). In der Literatur existieren widersprüchliche Aussagen zur Rolle von Galektin-3 bezüglich Metastasierung und Invasion in Pankreaskarzinomen. Eine Verringerung der Menge an Galektin-3 inhibiert die Migration und Invasion von Karzinomzellen (Kobayashi et al., 2011), wohingegen eine erniedrigte Expression von Galektin-3 mit fortgeschrittenem Tumorstadium, Tumordifferenzierung und Metastasierung assoziiert ist (Shimamura et al., 2002).

### 1.3 Metastasierung

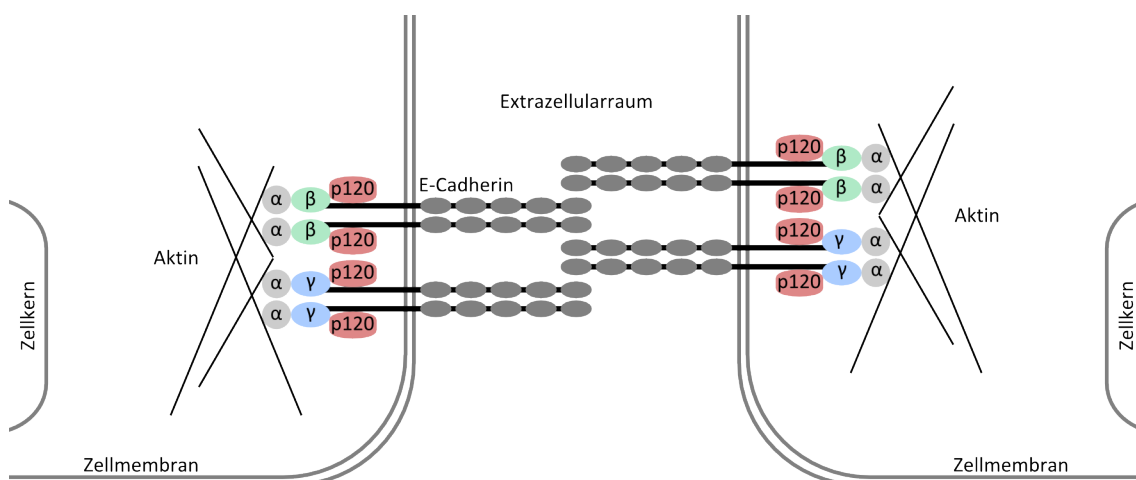
Unter Metastasierung wird die Streuung von Karzinomzellen aus dem Primärtumor in andere Organsysteme und ihre dortige, unkontrollierte Vermehrung bezeichnet (Fidler, 2003). Die Metastasierung bleibt in 90 % der Fälle der Grund für den tödlichen Ausgang nach Erkrankung an einem soliden Tumor. Die Metastasierung ist ein ineffizienter Prozess und nur eine sehr geringe Zahl der Karzinomzellen des Primärtumors besitzt das Potenzial zu metastasieren (Gupta & Massagué, 2006; Reymond et al., 2013). Der Metastasierungsprozess erfordert einige Schritte, welche durchlaufen werden müssen, damit es zur Entstehung einer Fernmetastase kommen kann. Hierzu gehören die Dissoziation der Tumorzellen aus dem Primärtumor, das Durchbrechen der Basalmembran und invasives Wachstum in das Nachbargewebe, die Intravasation der Tumorzellen in Blut- und Lymphgefäße, das Überleben der Tumorzellen in der Zirkulation, die Extravasation und Ansiedlung der Tumorzellen in peripheren Organen sowie die Induktion der Angiogenese (Chambers et al., 2002; Fidler, 2003). Eine charakteristische Veränderung der frühen Schritte ist die Reduktion der Zell-Zell-Adhäsion, die typisch für differenzierte epitheliale Zellen ist. Letztere ist in vielen Tumoren mit einem Verlust des E-Cadherin-Catenin-Adhäsionskomplexes verbunden (Geiger & Peeper, 2009).

### 1.4 Zell-Zell-Kontakte

Epithelien sind der Ursprung der meisten soliden Tumore. Epithelien sind vom Stroma durch eine Basalmembran getrennt und hochorganisiert durch laterale Zell-Zell-Kontakte (Geiger & Peeper, 2009). Es werden verschiedene Typen von Kontaktverbindungen zwischen benachbarten Zellen unterschieden, die von apikal nach basolateral in der folgenden Reihenfolge angeordnet sind: *Tight Junctions*, *Adherens Junctions* und Desmosomen. In der vorliegenden Arbeit liegt besonderes Augenmerk auf den *Adherens Junctions* (Abbildung 1.1), auf die im Folgenden genauer eingegangen wird.

Ein Bestandteil der *Adherens Junctions* sind die transmembranären Cadherine. Die Superfamilie der Cadherine lässt sich in die klassischen Cadherine, die an der calciumabhängigen Zell-Zell-Adhäsion beteiligt sind und in die nicht-klassischen Cadherine einteilen, zu welchen die desmosomalen Cadherine, die Subfamilie der Protocadherine und die Flamingo-Cadherine gehören. Klassische Cadherine bilden

homophile Bindungen mit Cadherinen auf der Oberfläche der Nachbarzelle aus. Die klassischen Cadherine sind Transmembranproteine mit fünf charakteristischen, sich wiederholenden extrazellulären Domänen, welche jeweils aus ca. 110 Aminosäuren bestehen und einem cytoplasmatischen Teil, welcher Catenine an verschiedenen Stellen bindet.  $\beta$ - und  $\gamma$ -Catenin binden an derselben Stelle, am C-Terminus des Cadherins, und vermitteln über  $\alpha$ -Catenin und andere Proteine eine Verbindung zum Aktincytoskelett. P120-Cadherin interagiert mit der Juxta-Membran-Region des Cadherins und stabilisiert die Cadherine an der Zellmembran (Cavallaro & Christofori, 2004; Leckband & de Rooij, 2014; Niessen et al., 2011; Oda & Takeichi, 2011).



**Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der *Adherens Junctions*.** Das Transmembranprotein E-Cadherin, ein klassisches Cadherin, enthält fünf charakteristische extrazelluläre Domänen mit denen Cadherine benachbarter Zellen calciumabhängig miteinander in Verbindung stehen. Der intrazelluläre Teil der Cadherine bindet C-terminal  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Catenin.  $\beta$ - und  $\gamma$ -Catenin stellen über  $\alpha$ -Catenin eine Verbindung zum Aktincytoskelett her. P120-Catenin interagiert mit der Juxta-Membran-Region des Cadherins, wodurch diese an der Zellmembran stabilisiert werden. Abkürzungen:  $\alpha$ :  $\alpha$ -Catenin,  $\beta$ :  $\beta$ -Catenin,  $\gamma$ :  $\gamma$ -Catenin, p120: p120-Catenin

E-Cadherin, ein klassisches Cadherin, ist das Schlüsselprotein bei der Aufrechterhaltung der Zellpolarität und der Organisation des Epitheliums. In den meisten Tumoren epithelialen Ursprungs kommt es zum Verlust der E-Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Adhäsion, was gleichzeitig mit erhöhter Malignität des Tumors einhergeht (Cavallaro & Christofori, 2004).

### 1.5 Catenine

Die durch *Adherens Junctions* vermittelte Zell-Zell-Adhäsion ist abhängig von der Verknüpfung der transmembranären Cadherine mit dem darunterliegenden Aktincytoskelett. Catenine vermitteln zwischen der cytoplasmatischen Domäne des Cadherins und dem Aktincytoskelett.



$\alpha$ -Catenin besteht aus drei Domänen mit hoher Homologie zu Vinculin, einer N-terminalen  $\beta$ -Catenin Bindungsstelle und einer C-terminalen Domäne, welche mit F-Aktin interagiert und die Verbindung des Cadherin- $\beta$ -Catenin-Komplexes mit dem Aktincytoskelett ermöglicht (Vite et al., 2015).

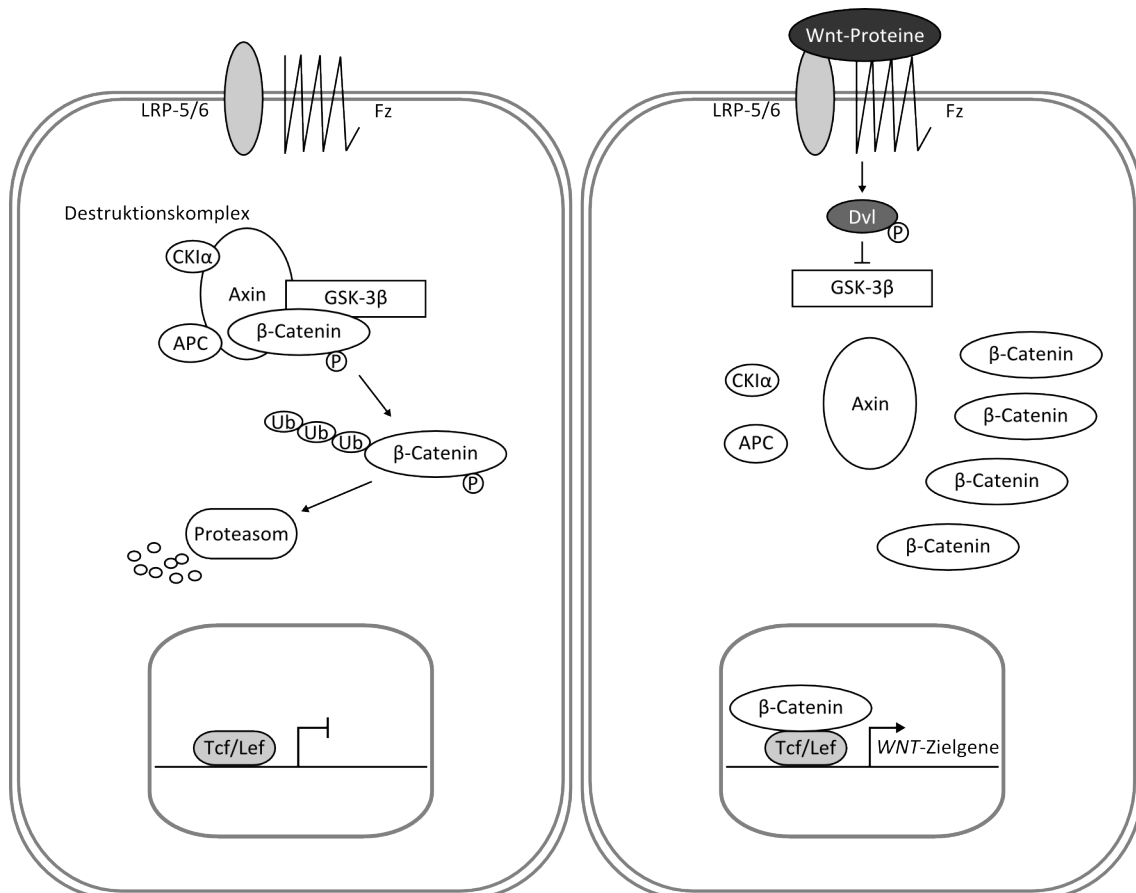
$\beta$ -Catenin wurde ursprünglich als Segmentpolaritätsprotein Armadillo in *Drosophila* identifiziert. Es besteht aus 13 Armadillodomänen aus je 42 Aminosäuren, die in einer  $\alpha$ -Helixstruktur angeordnet sind (Hartsock & Nelson, 2008).  $\beta$ -Catenin spielt eine wichtige Rolle bei der Cadherin-vermittelten Zell-Zell-Adhäsion und im kanonischen Wnt-Signalweg (Kapitel 1.6) (Heuberger & Birchmeier, 2010).

$\gamma$ -Catenin, auch als Plakoglobin bekannt, ist Mitglied der Armadillo-Proteinfamilie und weist eine hohe Homologie zu  $\beta$ -Catenin auf.  $\gamma$ -Catenin ist das einzige Protein, das sowohl am Aufbau der Desmosomen als auch am Aufbau der *Adherens Junctions* beteiligt ist und spielt somit eine entscheidende Rolle bei der Zell-Zell-Adhäsion. Ähnlich wie  $\beta$ -Catenin ist  $\gamma$ -Catenin in der Lage mit Komponenten des Wnt-Signalweges zu interagieren und die Genregulation durch Bindung an Transkriptionsfaktoren der Tcf/Lef-Familie zu beeinflussen (Kapitel 1.6). Die genaue Funktion von  $\gamma$ -Catenin hierbei ist im Gegensatz zu der Funktion von  $\beta$ -Catenin wenig verstanden (Giles et al., 2003; Swope et al., 2013).

### 1.6 Catenin-abhängiger Wnt-Signalweg

Wnt-Proteine, eine große Familie cystinreicher sezernierter Glycoproteine, kontrollieren die Entwicklung einer Reihe von Organismen von Fadenwürmern bis zum Menschen (Wodarz & Nusse, 1998). Der intrazelluläre Wnt-Signalweg spielt eine Rolle bei einer Vielzahl von Prozessen, wie der Zellproliferation, der Zellmigration und der Organentwicklung. Eine Fehlregulation des Wnt-Signalweges führt zu Entwicklungsstörungen und zur Karzinogenese (Miller et al., 1999). Es sind 19 *WNT*-Gene im Säugetiergenom identifiziert. Der  $\beta$ -Catenin-abhängige Wnt-Signalweg kann durch sieben von 19 Wnt-Proteinen aktiviert werden. Hierzu zählen Wnt-1, Wnt-2, Wnt-3, Wnt-3a, Wnt-4, Wnt-8 und Wnt-10b (Xi & Chen, 2014). Wenn kein Wnt-Protein an die Zelle bindet (Abbildung 1.2), wird  $\beta$ -Catenin durch die Caseinkinase I $\alpha$  (CKI $\alpha$ ) und die Glycogen Synthasekinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) in einem Destruktionskomplex, der *adenomatous polyposis coli* (APC) und *axis inhibition protein* (Axin) enthält, phosphoryliert.

Phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin wird durch den E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex ubiquitiniert und anschließend proteasomal abgebaut (Behrens et al., 1998; Polakis, 2000; Song et al., 2009). Wnt-Proteine binden an ihre Zielzellen über *frizzled* (Fz) Rezeptoren und einen Korezeptor Lipoprotein Rezeptor-verwandtes Protein 5 oder 6 (LRP-5/6). Die Bindung führt zu einer Phosphorylierung und dadurch zur Aktivierung des intrazellulären Proteins *dishevelled* (Dvl), zur Inaktivierung der GSK-3 $\beta$  und damit zu einem Zerfall des Destruktionskomplexes. Nun kann  $\beta$ -Catenin nicht mehr abgebaut werden und wird in der Zelle angereichert.  $\beta$ -Catenin transloziert in den Nukleus und bildet einen Komplex mit Transkriptionsfaktoren aus der Familie der Tcf/Lef-Transkriptionsfaktoren. Dadurch wird die Transkription einer Vielzahl von Zielgenen, wie beispielsweise von *AXIN-2*, *C-MYC* und *CYCLIN D1*, aktiviert (Xi & Chen, 2014). Mehr als 90 % aller kolorektalen Karzinome haben eine aktivierende Mutation im Wnt-Signalweg. In 80 % ist das *APC*-Gen betroffen und in 10-15 % der Fälle das *CTNNB1*-Gen, welches für  $\beta$ -Catenin codiert. Durch diese Mutationen wird die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin durch die GSK-3 $\beta$  verhindert und es kommt zu einer Akkumulation von  $\beta$ -Catenin im Cytosol und zur Translokation in den Nukleus (Song et al., 2009).



**Abbildung 1.2: Der kanonische Wnt-Signalweg.** Wenn kein Wnt-Protein an die Zelle bindet, wird  $\beta$ -Catenin in einem Destruktionskomplex, bestehend aus der  $CKI\alpha$ , der GSK-3 $\beta$ , Axin und APC, phosphoryliert. Anschließend wird phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin durch den E3-Ubiquitin-Ligase Komplex ubiquitiniert und es erfolgt die proteasomale Degradation. Wenn ein Wnt-Protein an einen Fz-Rezeptor und LPR-5 oder 6 Korezeptor bindet, wird das intrazelluläre Protein Dvl phosphoryliert und dadurch aktiviert. Dies führt zu einer Inaktivierung der GSK-3 $\beta$  und einem Zerfall des Destruktionskomplexes.  $\beta$ -Catenin kann nicht mehr abgebaut werden und reichert sich in der Zelle an.  $\beta$ -Catenin transloziert in den Zellkern und es kommt zur Beeinflussung der Transkription  $\beta$ -Catenin-abhängiger Zielgene. Abkürzungen: APC: *adenomatous polyposis coli*, Axin: *axis inhibition protein*,  $CKI\alpha$ : Caseinkinase  $\alpha$ , Dvl: *dishevelled*, Fz: *frizzled*, GSK-3 $\beta$ : Glycogen Synthasekinase-3 $\beta$ , LPR-5/6: Lipoprotein Rezeptor-verwandtes Protein 5 oder 6

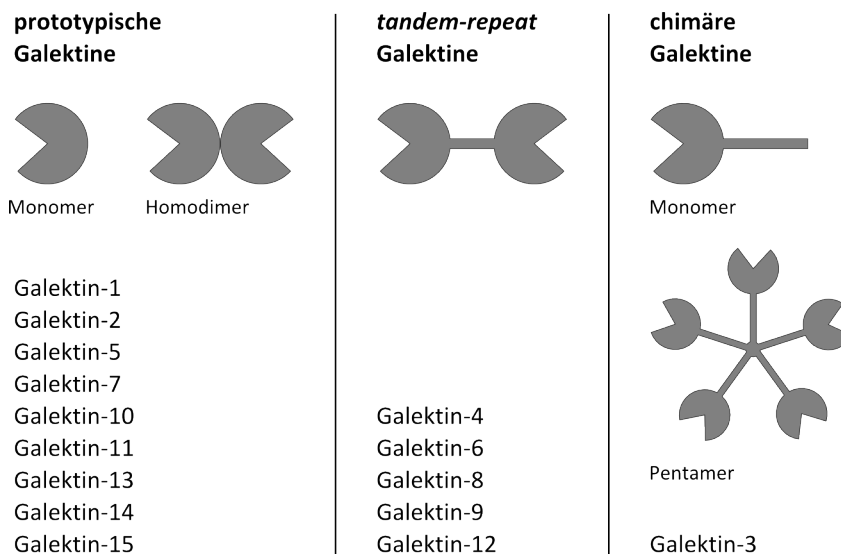
## 1.7 Galektine

Galektine gehören zur Familie der Lektine und binden  $\beta$ -Galaktoside mit einer hohen Affinität (Barondes et al., 1994a; Hughes, 1997). Galektine kommen im Tierreich ubiquitär vor. Bisher wurden in Säugetieren 15 Galektine identifiziert. Die Gene, die für Galektine codieren, werden *LGALS* (*lectin, galactoside-binding, soluble*) genannt (Barondes et al., 1994b).

Allen Galektinen ist gemein, dass sie eine oder zwei *carbohydrate-recognition domains* (CRDs) besitzen. Eine CRD besteht aus ca. 130 Aminosäuren und ist für die Fähigkeit verantwortlich, spezifische Kohlenhydratstrukturen zu binden. Anhand der Anzahl der CRDs und ihrer Struktur lassen sich die Galektine in verschiedene Gruppen einteilen. Wie in Abbildung 1.3 dargestellt, lassen sie sich in prototypische Galektine, *tandem-repeat* Galektine und chimäre Galektine unterteilen (Barondes et al., 1994b; Leffler, 2001).

Prototypische Galektine besitzen eine CRD. Zu ihnen gehören Galektin-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14, -15. *Tandem-repeat* Galektine zeichnen sich durch zwei homologe CRDs aus, die durch eine Linkerregion von bis zu 70 Aminosäuren miteinander verbunden sind. Zu den *tandem-repeat* Galektinen gehören Galektin-4, -6, -8, -9 und -12. Einige von ihnen zeichnen sich durch verschiedene Isoformen aus, die sich in der Anzahl der Aminosäuren der Linkerregion voneinander unterscheiden. Der Gruppe der chimären Galektine gehört nur Galektin-3 an. Galektin-3 besitzt eine ca. 120 Aminosäuren lange, prolin- und glycinreiche Aminosäurekette, an die eine CRD angeknüpft ist.

Galektine besitzen die Fähigkeit Kohlenhydrate bi- oder multivalent zu binden. Einige prototypische Galektine können Homodimere bilden. *Tandem-repeat* Galektine besitzen zwei CRDs und Galektin-3 kann als Pentamer vorkommen (Cooper, 2002; Leffler et al., 2004; Liu & Rabinovich, 2005; Yang et al., 2008).



**Abbildung 1.3: Einteilung der Galektine.** Galektine können anhand ihrer Struktur in drei Untergruppen eingeteilt werden. Galektin-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14, -15 gehören mit einer CRD zur Gruppe der prototypischen Galektine. Prototypische Galektine können als Monomer vorliegen oder Homodimere bilden. Galektin-4, -6, -8, -9, -12 bilden die *tandem-repeat* Galektine und besitzen zwei CRDs, die durch eine Linkerregion miteinander verbunden sind. Galektin-3 gehört zur Gruppe der chimären Galektine. Galektin-3 besitzt eine CRD und kann als Monomer oder Pentamer vorliegen. Abkürzungen: CRP: *carbohydrate-recognition domain*

Galektine besitzen diverse biologische Funktionen. Sie können extra- und intrazelluläre Prozesse beeinflussen. Intrazellulär können Galektine im Cytoplasma, im Nukleus oder an der Zellmembran lokalisiert sein und durch Protein-Protein-Interaktionen intrazelluläre Prozesse, wie prä-mRNA Splicing, Zellzyklusregulation, Apoptose und Zellproliferation, beeinflussen (Liu et al., 2002). Galektine werden über einen nicht-klassischen Sekretionsmechanismus in den Extrazellularraum sekretiert, da sie keine Signalsequenz besitzen (Cooper, 2002; Cooper & Barondes, 1990). Extrazellulär können Galektine mit Glycoproteinen oder Glycolipiden der Zelloberfläche und der Zellmatrix interagieren und spielen so eine Rolle bei der Zell-Zell- und der Zell-Matrix-Interaktion (Liu & Rabinovich, 2005).

Galektine sind in diverse physiologische und pathophysiologische Prozesse involviert (Storti et al., 2017). Hierbei handelt es sich um Immun- und Entzündungsreaktionen, neuronale Degeneration, Diabetes, Atherosklerose und Wundheilung (Yang et al., 2008). Darüber hinaus spielen Galektine eine Rolle bei diversen Krankheitsbildern, wie beispielsweise Karzinomkrankungen, Fibrose verschiedener Organe und Erkrankungen des Herzens (Johannes et al., 2018).

### 1.7.1 Galektin-3

Galektin-3 gehört als einziges Galektin der Gruppe der chimären Galektine an. Galektin-3 ist in eine Vielzahl von biologischen Prozessen, wie Zellwachstum, Apoptose, Tumorentwicklung und -progression sowie in prä-mRNA Splicing, involviert (Dumic et al., 2006). Galektin-3 ist sowohl im Cytosol als auch im Nukleus lokalisiert. Für die Funktion, die Galektin-3 in der Zelle besitzt, ist die zelluläre Sublokalisierung verantwortlich (Chung et al., 2015). Cytoplasmatisches Galektin-3 kann mit GTP-gebundenem K-Ras interagieren, wodurch Ras-abhängig PI3K und Raf-1 konstitutiv aktiviert werden (Elad-Sfadia et al., 2004).

Im Zellkern kann Galektin-3 die Tumorentstehung durch Regulation des Zellzyklus beeinflussen, indem es an  $\beta$ -Catenin bindet und so die Transkription von zellzyklusregulierenden Zielgenen, wie *CYCLIN D1* und *C-MYC*, verändert (Shimura et al., 2004).

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Galektin-3 als auch  $\beta$ -Catenin Substrate der CKI und der GSK-3 $\beta$  sind. Die Phosphorylierung durch die CKI erfolgt an Ser<sup>6</sup> und die der GSK-3 $\beta$  an der Sequenz Ser<sub>92</sub>XXXSer<sub>96</sub>. Durch die Phosphorylierung von Galektin-3 an Ser<sup>6</sup> wird der nukleäre Export reguliert (Shimura et al., 2005; Takenaka et al., 2004). In humanen Kolonkarzinomzellen kommt es durch Galektin-3 zu einer Hochregulierung der  $\beta$ -Catenin-abhängigen Genexpression und dadurch zu einer Aktivierung des Wnt-Signalweges. Dies geschieht durch Induktion der Phosphorylierung der GSK-3 $\beta$  an Ser<sup>9</sup> durch den PI3K/Akt-Signalweg (Song et al., 2009).

In Schilddrüsenkarzinomzellen besitzt Galektin-3 eine modulierende Funktion bei der Zellmigration durch Beeinflussung verschiedener Signalwege, wie beispielsweise des MAPK- und Wnt-Signalweges (Zheng et al., 2017).

### 1.7.2 Galektin-8

Das Galektin-8-Gen (*LGALS8*) liegt auf Chromosom 1 (1q42.11) und umfasst 33 Kilobasenpaare. Galektin-8 kommt in sechs verschiedenen Isoformen vor (Zick et al., 2004). Drei Isoformen besitzen zwei CRDs und gehören den *tandem-repeat* Galektinen an. Die weiteren drei Isoformen gehören mit einer CRD zu den prototypischen Galektinen (Bidon-Wagner & Le Pennec, 2004). Die *tandem-repeat* Galektin-8 Isoformen unterscheiden sich durch die Länge ihrer Linkerregion, die durch Exon 11 des *LGALS8*-Gens bestimmt wird. Es können Galektin-8 long, mit der längsten

Linkerregion, Galektin-8 medium und Galektin-8 short, mit der kürzesten Linkerregion, unterschieden werden (Elola et al., 2014).

Extrazelluläres Galektin-8 verhält sich wie ein Zellmatrix-Protein, ähnlich wie Fibronektin, indem es die Zelladhäsion durch Bindung an bestimmte Integrine moduliert (Hadari et al., 2000; Levy et al., 2001; Zick et al., 2004). Die Interaktion zwischen Galektin-8 und Integrinen kann Signalwege, wie den MAPK- oder den PI3K-Signalweg, aktivieren (Levy et al., 2003).

Galektin-8 ist ebenfalls ein Interaktionspartner von K-Ras und dient als Regulator der K-Ras-induzierten Phosphorylierung in verschiedenen Ras-abhängigen Signalwegen, wie dem Raf/MEK/ERK- und dem PI3K/Akt-Signalweg (Barnard, 2015).

In verschiedenen Tumoren ist die Expression von Galektin-8 verändert. Allerdings ist diese uneinheitlich in einigen hoch- und in anderen herunterreguliert (Elola et al., 2014). In MDCK-Zellen (*Madin-Darby canine kidney cells*) konnte durch Überexpression von Galektin-8 eine gesteigerte Proliferation, Migration und Invasion nachgewiesen werden (Oyanadel et al., 2018).

### **1.7.3 Galektine in Tumoren**

Galektine sind in Karzinomzellen häufig überexprimiert. Die Expression der Galektine korreliert in der Regel mit der Aggressivität eines Tumors und der Tendenz zur Metastasierung. Galektine scheinen damit Einfluss auf den Verlauf einer Tumorerkrankung und somit auf die Prognose zu nehmen (van den Brûle et al., 2004). Galektine sind für eine Resistenz der Tumorzellen verschiedener Karzinome gegenüber platinhaltigen Chemotherapeutika verantwortlich. Galektin-1 erhöht die Resistenz des Bronchialkarzinoms gegenüber Cisplatin durch Aktivierung des MAPK/COX-2-Signalweges (Chung et al., 2012). Galektin-3 fördert die Chemoresistenz des Prostatakarzinoms, des Gallengangkarzinoms und des Schilddrüsenkarzinoms (Lavra et al., 2009; Lin et al., 2009; Wang et al., 2010; Wongkham et al., 2009). Die Inhibition von Galektin-3 sensibilisiert Prostatakarzinomzellen für die Behandlung mit Cisplatin (Wang et al., 2010). Darüber hinaus wurde beschrieben, dass verschiedene Galektine in der Lage sind, die Apoptose von Tumorzellen zu beeinflussen. Galektin-3 besitzt eine anti-apoptotische Wirkung in verschiedenen Tumoren, wohingegen für Galektin-1, -7, und -9 eine pro-apoptotische Wirkung nachgewiesen werden konnte (Takenaka et al.,

2004). Neue Therapeutika, die insbesondere auf die Beeinflussung von Galektin-3 abzielen, könnten zu einer effektiven Behandlungsstrategie von Krebserkrankungen beitragen (Newlaczył & Yu, 2011). Vorklinische und frühe klinische Studien erbrachten durch eine Kombinationstherapie aus einem Galektin-3-Inhibitor und einem PD-1-Inhibitor vielversprechende Ergebnisse, wie eine erniedrigte Tumorlast und eine erhöhte Überlebensrate beim fortgeschrittenen malignen Melanom (Seguin & Féral, 2018).

### 1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

Galektine können im Cytoplasma, an der Membran und im Zellkern epithelialer Zellen vorkommen und besitzen je nach Lokalisation unterschiedliche Funktionen. Es konnte gezeigt werden, dass nukleäres Galektin-3 die Genexpression durch Beeinflussung von Transkriptionsfaktoren verändert. Galektin-3 interagiert mit  $\beta$ -Catenin, verändert die Transkriptionsstärke von Transkriptionsfaktoren der Tcf/Lef-Familie und reguliert somit die Expression von verschiedenen Zielgenen. Im Cytoplasma kann Galektin-3 die Phosphorylierung der GSK-3 $\beta$  modifizieren, wodurch es zur Akkumulation von  $\beta$ -Catenin und ebenfalls zur verstärkten Genexpression kommt. Für Galektin-8 wurde der Einfluss auf den Wnt-Signalweg bisher nicht untersucht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob Galektin-8, im Vergleich zu Galektin-3, in Lungen- und Pankreaskarzinomzellen die Wirkung des Wnt-Signalweges beeinflusst und welche molekularen Mechanismen darin involviert sind. Dazu sollte analysiert werden, ob die beiden Galektine an Catenine binden und ob das Auswirkungen auf die Aktivität des Wnt-Signalweges hat.

Da  $\beta$ - und  $\gamma$ -Catenin eine hohe Sequenzhomologie aufweisen und in den *Adherens Junctions* ausgetauscht werden können, sollte sowohl die Interaktion von  $\beta$ -Catenin als auch von  $\gamma$ -Catenin mit Galektin-3 und -8 untersucht werden. In einem ersten Schritt sollte die Lokalisation von Galektin-3 und -8 sowie von  $\beta$ - und  $\gamma$ -Catenin in der Zelle mittels Western-Blot und Immunfluoreszenz analysiert werden. Anhand von Immunpräzipitationsstudien sollte überprüft werden, ob zelluläre Catenine mit endogenem oder transient exprimiertem Galektin-3 oder -8 im Komplex vorliegen. Mit Hilfe von Genreporterassays sollten Signalwege untersucht werden, die durch ektop exprimiertes Galektin-3 oder -8 moduliert werden. Es galt zu analysieren, ob durch Galektin-3 oder -8 die Aktivität der  $\beta$ -Catenin-kontrollierten Genexpression verändert werden kann. Hierbei stand der Wnt-Signalweg im Vordergrund.



## 2. Material

### 2.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden in der höchsten erhältlichen Qualität von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Merck Millipore (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und Thermo Scientific (Dreieich) bezogen.

### 2.2 Verbrauchsmaterialien

12-Well Platte	BD Biosciences, Heidelberg
12-Well Platte, für Suspensionskultur	Eppendorf, Hamburg
96-Well Mikroplatte	Greiner Bio-One, Frickenhausen
96-Well Mikroplatte, schwarz	Nunc, Roskilde, Dänemark
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
Kanülen 26 G (0,45 × 16 mm)	BD Biosciences, Heidelberg
MACS Separationssäulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Objektträger	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen 20 µl und 200 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen 1000 µl	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Polypropylenröhrchen 15 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Polypropylenröhrchen 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Protran 0,45 µm Nitrozellulosemembran	GE Healthcare, Freiburg
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Steritop Filter Zellkultur	Merck Millipore, Darmstadt
Tuberkulinspritzen 1 ml	BD Biosciences, Heidelberg
Whatman Chromatographie-Papier	GE Healthcare, Freiburg
Zellkulturplatte 24-Well und 6-Well	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschale 60 mm und 100 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht

### 2.3 Enzyme und molekularbiologische Kits

<i>µMACS GFP Isolation Kit</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
<i>DNA-spin Plasmid DNA Purification Kit</i>	Hiss Diagnostics, Freiburg
<i>Dual-Luziferase Reporter Assay System</i>	Promega, Mannheim

NucleoBond Finalizer

Macherey-Nagel, Düren

Restriktionsenzyme und Puffer

Thermo Scientific, Dreieich

## 2.4 Primäre Antikörper

Tabelle 1: Primäre Antikörper

Antigen	Verdünnung WB/IF/IP	Spezies	Hersteller und Bestellnummer	Größe in kDa
$\alpha$ -Catenin	WB 1:1000 in 1)	Maus	BD Biosciences Best.-Nr. C21620	102
$\alpha$ -Catenin	WB 1:5000 in 1)	Kaninchen	Sigma-Aldrich Best.-Nr. C2081	102
$\beta$ -Aktin	WB 1:5000 in 1)	Maus	Sigma-Aldrich Best.-Nr. A5441	42
$\beta$ -Catenin	WB 1:2000 in 1)	Maus	BD Biosciences Best.-Nr. C19220	92
$\beta$ -Catenin	WB 1:5000 in 1) IF 1:500	Kaninchen	Sigma-Aldrich Best.-Nr. C-2206	92
$\gamma$ -Catenin	WB 1:5000 in 1) IF 1:500	Maus	BD Biosciences Best.-Nr. 610253	82
Caveolin	WB 1:3000 in 1)	Kaninchen	BD Biosciences Best.-Nr. 610060	22
E-Cadherin	WB 1:4000 in 1)	Maus	BD Biosciences Best.-Nr. 610182	120
GAPDH	WB 1:5000 in 1)	Kaninchen	Rockland Best.-Nr. 600-401-A33	38
GFP	WB 1:1000 in 1)	Maus	Roche Best.-Nr. 11814460001	27
GFP-HRP	WB 1:3000 in 3)	Maus	Miltenyi Biotec Best.-Nr. 130-091-833	27
humanes Galektin-3	WB 1:2000 in 2) IF 1:100	Ziege	R&D Systems Best.-Nr. AF1154	29

Antigen	Verdünnung WB/IF/IP	Spezies	Hersteller und Bestellnummer	Größe in kDa
humanes Galektin-3	IF 1:100	Maus	R&D Systems Best.-Nr. MAB1154	29
humanes Galektin-8	IF 1:50-1:100	Ziege	R&D Systems Best.-Nr. AF1305	36 u.
humanes Galektin-8	WB 1:500 in 2) IF 1:50	Maus	R&D Systems Best.-Nr. MAB1305	36 u. 40
K-Ras (F234)	WB 1:500 in 1)	Maus	Santa Cruz Best.-Nr. sc-30	21
Pan-Ras	WB 1:500 in 3)	Maus	Calbiochem Best.-Nr. OP40	21
p120-Catenin	WB 1:1000 in 1)	Maus	BD Biosciences Best.-Nr. 610134	90- 120
p120-Catenin (S-19)	WB 1:500 in 1)	Kaninchen	Santa Cruz Best.-Nr. sc-1101	90- 120
Rho GDI $\alpha$ (K-21)	WB 1:1000 in 1)	Kaninchen	Santa Cruz Best.-Nr. sc-359	30
Vimentin	WB 1:1000 in 1)	Kaninchen	Cell Signaling Technology Best.-Nr. 5741	57
Vinculin	WB 1:4000 in 1)	Maus	Sigma-Aldrich Best.-Nr. V9131	116

1) 3 % BSA in TBS-T

2) 2 % *ECL Blocking Agent*, GE Healthcare in TBS

3) 0,5 % Milchpulver in TBS-T

## 2.5 Sekundäre Antikörper

Um Galektine nachzuweisen, wurde der Sekundärantikörper in 0,4 % *ECL Blocking Agent* in TBS angesetzt. Zum Nachweis von Pan-Ras wurde der sekundäre Antikörper in TBS verdünnt. Das Ansetzen der Sekundärantikörper zur Detektion aller weiteren Proteine erfolgte in 3 % BSA in TBS-T.

### 2.5.1 Sekundäre Antikörper für Western-Blot

Tabelle 2: Sekundäre Antikörper für Western-Blot

Antikörper	Prinzip	Verdünnung	Hersteller und Bestellnummer
anti-Ziege IRDye 680LT	Infrarot	1:150000	LI-COR Biosciences, Bad Homburg vor der Höhe, Best.-Nr. 92668024
anti-Maus IRDye 680LT	Infrarot	1:150000	LI-COR Biosciences, Bad Homburg vor der Höhe, Best.-Nr. 92668020
anti-Kaninchen IRDye 680LT	Infrarot	1:150000	LI-COR Biosciences, Bad Homburg vor der Höhe, Best.-Nr. 92668021
anti-Ziege IRDye 800CW	Infrarot	1:150000	LI-COR Biosciences, Bad Homburg vor der Höhe, Best.-Nr. 92632214
anti-Maus IRDye 800CW	Infrarot	1:150000	LI-COR Biosciences, Bad Homburg vor der Höhe, Best.-Nr. 92632210
anti-Kaninchen IRDye 800CW	Infrarot	1:150000	LI-COR Biosciences, Bad Homburg vor der Höhe, Best.-Nr. 92632211
anti-Ziege IgG	HRP-gekoppelt	1:5000	Thermo Scientific, Dreieich, Best.-Nr. 31402
anti-Maus IgG	HRP-gekoppelt	1:5000	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Best.-Nr. 7076
anti-Kaninchen IgG	HRP-gekoppelt	1:5000	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Best.-Nr. 7074

### 2.5.2 Sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenz

Tabelle 3: Sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenz

Antikörper	Prinzip	Verdünnung	Hersteller und Bestellnummer
anti-Ziege IgG	Cy3	1:3000	Rockland, Limerick, USA, Best.-Nr. 605-704-125
anti-Maus IgG	Alexa488	1:1000-1:3000	Thermo Scientific, Dreieich, Best.-Nr. A-11001
anti-Maus IgG	Cy3	1:1000-1:3000	Dianova, Hamburg, Best.-Nr. 115-165-003
anti-Kaninchen IgG	Alexa488	1:1000-1:3000	Thermo Scientific, Dreieich, Best.-Nr. A-11008
anti-Kaninchen IgG	Cy3	1:1000-1:3000	Dianova, Hamburg, Best.-Nr. 111-166-045

### 2.6 Molekulargewichtsmarker

#### 2.6.1 Marker für die Agarose-Gelelektrophorese

*1 kb DNA Ladder*, New England Biolabs, Frankfurt am Main (Best.-Nr. N3232L)

Größe in Basenpaaren: 10.000, 8.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.000, 2.000, 1.000, 500

#### 2.6.2 Marker für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

*Page Ruler Prestained Protein Ladder*, Thermo Scientific, Dreieich (Best.-Nr. 26617)

Molekulargewicht in kDa: 180, 130, 95, 72, 55, 43, 34, 26, 17, 10

*Precision Plus Protein Kaleidoscope Prestained Protein Standards*, Bio-Rad, München  
(Best.-Nr. 161-0375)

Molekulargewicht in kDa: 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15, 10

### 2.7 Rekombinante Proteine

rekombinantes humanes Galektin-3

R&D Systems, Wiesbaden

Best.-Nr. 1154-GA

rekombinantes humanes Galektin-8

R&D Systems, Wiesbaden

Best.-Nr.1305-GA

## 2.8 Transfektionsreagenzien

Tabelle 4: Transfektionsreagenzien

Reagenz	Zelllinie	Hersteller und Bestellnummer
DMRIE-C Reagent	Panc-1	Thermo Scientific, Dreieich, Best.-Nr. 10459-014
Lipofectamine 2000	H1299	Thermo Scientific, Dreieich, Best.-Nr. 11668019
Polyethylenimin (PEI)	HEK-293	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Best.-Nr. 9002986

## 2.9 Expressionsvektoren

Tabelle 5: Expressionsvektoren

Plasmid	Bezugsquelle
pcDNA3.1	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA3.1/Galektin-3	AG Giehl, Universität Gießen
pcDNA3/Galektin-8 short	AG Giehl, Universität Gießen
pcDNA3/Galektin-8 long	AG Giehl, Universität Gießen
pcDNA3/ $\beta$ -Catenin	AG Menke, Universität Gießen
pGL3/TOPflash	Promega, Mannheim
pRL-TK	Promega, Mannheim
pEGFP-N1	BD Biosciences, Heidelberg
pEGFP-C1/Galektin-3	AG Giehl, Universität Gießen
pEGFP-C1/Galektin-8 long	AG Giehl, Universität Gießen
SRE.L	AG Posern, Universität Halle

## 2.10 Prokaryotische Zellstämme

Verwendet wurden *One Shot TOP10 Chemically Competent E. coli* Bakterienzellen (Invitrogen, Groningen, Niederlande).

## 2.11 Eukaryotische Zelllinien

Tabelle 6: Eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Bezugsquelle	Bestellnr.
293 [HEK-293]	embryonale Nierenzellen	ATCC	CRL-1573

Zelllinie	Herkunft	Bezugsquelle	Bestellnr.
Calu-3	Adenokarzinom der Lunge	ATCC	CRL-HTB-55
NCI-H1299	Adenokarzinom der Lunge	ATCC	CRL-5803
HCC-44	Adenokarzinom der Lunge	DSMZ	ACC 534
Panc-1	epitheliales Pankreaskarzinom	ATCC	CRL-1469

## 2.12 Geräte

Absorptions-Reader ELx800	BioTek, Bad Friedrichshall
Bakterienschüttler MaxQ400	Thermo Scientific, Dreieich
Centro XS <sup>3</sup> LB 960 Luminometer	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Fluoreszenzmikroskop IX81	OLYMPUS, Hamburg
Fusion-SL 3500.WL	Vilber Lourmat, Eberhardzell
HERACELL 150i CO <sub>2</sub> Inkubator	Thermo Scientific, Dreieich
Heraeus Megafuge 16R Kühlzentrifuge	Thermo Scientific, Dreieich
Kühlzentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen
LI-COR Odyssey Sa	LI-COR Biosciences, Bad Homburg vor der Höhe
MACS Separator und MACS MultiStand	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACSmix Tube Rotator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mikrozentrifuge Biofuge pico Heraeus	Thermo Scientific, Dreieich
NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer	Thermo Scientific, Dreieich
Sicherheitswerkbank Labgard	ibs tecnomara, Fernwald
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg
Wasseraufbereitungssystem Barnstead GenPure	Thermo Scientific, Dreieich
Ultrazentrifuge Optima MAX-E	Beckman Coulter, Krefeld
UV-Transilluminator GeneFlash	Syngene, Cambridge, England
Zellkulturzentrifuge Heraeus Labofuge 400	Thermo Scientific, Dreieich

**2.13 Software**

cellSens Dimension 1.6	OLYMPUS, Hamburg
EndNote basic 2018	Thomson Reuters, Frankfurt am Main
ImageJ 1.45b	U.S. National Institutes of Health, Bethesda, USA
Inkscape Version 0.91	Free Software Foundation, Boston, USA
Fusion Molecular Imaging Version 15.18	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Gen5 2.00	BioTek, Bad Friedrichshall
Image Studio Version 5.2	LI-COR Biosciences, Bad Homburg vor der Höhe
Microsoft Excel 2011 für Mac	Microsoft, München
Microsoft PowerPoint 2011 für Mac	Microsoft, München
Microsoft Word 2011 für Mac	Microsoft, München
MikroWin 2000 Version 4.41	Mikrotek Laborsysteme, Overath
ND-1000 V3.5.2	NanoDrop Technologies, Wilmington, USA



### 3. Methoden

Alle Methoden wurden nach etabliertem Standardprotokoll der AG Menke angewandt. Die verwendeten Puffer und Lösungen wurden ebenfalls nach Standardprotokoll in ultrareinem Wasser angesetzt.

#### 3.1 Molekularbiologische Methoden

##### 3.1.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Alle Arbeiten mit Zellen wurden an einer Sicherheitswerkbank durchgeführt, um Sterilität zu gewährleisten. Um optimale Wachstumsbedingungen herzustellen, wurden die Zellen bei 37 °C, 100 % Luftfeuchtigkeit und 10 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Alle 2-3 Tage erfolgte ein Wechsel des Wachstumsmediums der Zellen.

##### Wachstumsmedium

DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium

10 % (V/V) Fötales Rinderserum (FBS)

1 % (V/V) GlutaMAX (100 ×)

1 % (V/V) MEM Nicht-essentielle AS (100 ×)

Das Medium sowie alle Zusätze, wurden von life technologies, Darmstadt bezogen. Vor der Verwendung des Wachstumsmediums wurde dieses mit Hilfe des Steritop Filters (Merck Millipore, Darmstadt) steril filtriert.

##### 3.1.2 Passagieren von Zellen

Zur Kultivierung der Zellen wurden 100 mm Petrischalen verwendet. Hatten die Zellen eine Konfluenz von 80-100 % erreicht, wurden sie umgesetzt. Hierzu wurde das Wachstumsmedium abgesaugt und die Zellen vorsichtig mit 5 ml 1 × CMF-PBS gewaschen. Anschließend wurde 3 ml Trypsin-EDTA Lösung (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) tröpfchenweise auf die Zellen gegeben. Die Schale kam für 3-10 min in einen Inkubator, um die Trypsinreaktion zu beschleunigen bis alle Zellen von der Schale abgelöst waren. Es erfolgte die Zugabe von 5 ml Wachstumsmedium zum Stoppen der Wirkung des Trypsins und eine Überführung der Zellen in ein 15 ml Polypropylenröhrchen. Die Zellen wurden für 3 min bei 1000 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellsediment in 5-10 ml Medium vollständig resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in gewünschter Verdünnung auf neue Schalen ausgesät und durch kreuzförmiges Schwenken der Schalen gleichmäßig verteilt.

**CMF-PBS 1 ×**

140 mM NaCl

2,7 mM KCl

8 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

pH 7,4

**3.1.3 Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-Zählkammer**

Zur Bestimmung der Zellzahl in Lösungen wurden die Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Laboroptik, Lancing, England) gezählt. Es wurde ein geschliffenes Deckglas auf die Zählkammer gelegt, sodass sich Newtonsche Ringe bildeten. Nun wurde ein Tropfen Zellsuspension in den Spalt zwischen Deckglas und Zählkammer pipettiert. Mit Hilfe eines 10 × Objektivs wurde die Zellzahl in vier großen Quadraten ausgezählt und der Mittelwert berechnet. Der Mittelwert multipliziert mit dem Faktor 10<sup>4</sup> entspricht der Zellzahl in einem Milliliter Zellsuspension.

**3.1.4 Transiente Transfektion von HEK-293-Zellen mit PEI**

Die transiente Transfektion von DNA in HEK-293-Zellen erfolgte mit Polyethylenimin (PEI). Die Zellen wurden am Tag vor der Transfektion ausgesät. Die folgenden Volumina wurden gemäß Tabelle 7 eingesetzt. Als Transfektionsansatz wurde DMEM vorgelegt, die DNA und PEI hinzugefügt, gut gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Medium wurde von den zu transfizierenden Zellen abgesaugt, frisches Medium vorgelegt und der Transfektionsansatz tröpfchenweise auf die Zellen gegeben. Durch kreuzförmiges Schwenken wurde der Transfektionsansatz optimal im vorgelegten Medium verteilt. Nach 3 h erfolgte eine Mediumzugabe. 24-72 h nach Transfektion konnten die Zellen, wie in Kapitel 3.1.7 beschrieben, lysiert werden.

**Tabelle 7: Transiente Transfektion von HEK-293 mit PEI**

Format	Zellzahl	DNA	Rea- genz	Ansatz in	Medium vorgelegt	Medium- zugabe
24-Well	1 × 10 <sup>5</sup>	0,9 µg	1,5 µl	50 µl DMEM	300 µl	300 µl
60 mm Schale	3 × 10 <sup>6</sup>	7 µg	16 µl	100 µl DMEM	1,5 ml	1,5 ml
100 mm Schale	8 × 10 <sup>6</sup>	7 µg	30 µl	500 µl DMEM	3 ml	5 ml

### 3.1.5 Transiente Transfektion von Panc-1-Zellen mit DMRIE-C

Zur Transfektion von Panc-1-Zellen wurde DMRIE-C genommen. Die Zellen wurden am Tag vor der Transfektion ausgesät. Die Volumina, die bei der Transfektion verwendeten Reagenzien, wurden Tabelle 8 entnommen. Es wurden zwei verschiedene Lösungsansätze verwendet. Lösung 1 bestand aus der zu transfizierenden DNA, die zu Opti-MEM (life technologies, Darmstadt) pipettiert wurde, Lösung 2 aus Opti-MEM und DMRIE-C. Beide Lösungen wurden gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von Lösung 2 zu Lösung 1 wurde intensiv gemischt und weitere 20 min inkubiert. Die Zellen wurden mit DMEM gewaschen und DMEM wurde vorgelegt. Der Transfektionsansatz wurde gleichmäßig auf die Zellen getropft, nach 6 h erfolgte ein Mediumwechsel. Die Lyse der Zellen erfolgte 24-72 h nach Transfektion, wie in Kapitel 3.1.7 beschrieben.

**Tabelle 8: Transiente Transfektion von Panc-1-Zellen mit DMRIE-C**

Format	Zellzahl	DNA	Reagenz	Ansätze in	DMEM vorgelegt	Mediumwechsel
12-Well	$1 \times 10^5$	1,5 µg	3,0 µl	50 µl Opti-MEM	0,5 ml	1 ml
100 mm Schale	$3 \times 10^6$	8 µg	30 µl	500 µl Opti-MEM	4 ml	10 ml

### 3.1.6 Transiente Transfektion von H1299-Zellen mit Lipofectamine 2000

Um Plasmide in H1299-Zellen zu transfizieren, wurde Lipofectamine 2000 verwendet. Die Zellen wurden am Vortag der Transfektion ausgesät. Die bei der Transfektion verwendeten Volumina wurden gemäß Tabelle 9 eingesetzt. Als Lösung 1 wurde die DNA in Opti-MEM pipettiert, als Lösung 2 Lipofectamine 2000 in Opti-MEM. Beide Lösungen wurden gemischt und anschließend 5 min inkubiert. Es wurde Lösung 1 zu Lösung 2 gegeben, gemischt und für weitere 10 min inkubiert. Es schloss sich die Verteilung des Transfektionsansatzes auf die Zellen an. Nach 6 h fand ein Mediumwechsel statt. Nach 24-72 h wurden die Zellen gemäß Kapitel 3.1.7 lysiert.

**Tabelle 9: Transiente Transfektion von H1299-Zellen mit Lipofectamine 2000**

Format	Zellzahl	DNA	Reagenz	Ansätze in	Medium vorgelegt	Mediumwechsel
24-Well	$4 \times 10^4$	0,6 µg	1,5 µl	25 µl Opti-MEM	250 µl	500 µl

Format	Zellzahl	DNA	Rea- genz	Ansätze in	Medium vorgelegt	Medium- wechsel
6-Well	$5 \times 10^5$	2 µg	7 µl	50 µl Opti-MEM	1,5 ml	1,5 ml
100 mm Schale	$3 \times 10^6$	12 µg	30 µl	400 µl Opti-MEM	5 ml	10 ml

### 3.1.7 Herstellung von Zelllysaten

Die Herstellung von Zelllysaten erfolgte auf Eis, um einem Abbau der Proteine entgegenzuwirken. Das Medium der Zellen wurde abgesaugt und die Zellen zur Entfernung der Mediumreste mit eiskaltem  $1 \times$  CMF-PBS gewaschen. Bei transfizierten Zellen entfiel der Waschschrift, damit ein mögliches Ablösen der Zellen verhindert werden konnte. Um die Zellen zu lysieren, wurde  $1 \times$  Lysispuffer mit  $1 \times$  Protease-Inhibitor-Mix versetzt. Für eine 100 mm Schale benötigte man je nach Konfluenz 400-500 µl Lysispuffer, für eine 60 mm Schale 150-200 µl, für eine 12-Well Platte 100-120 µl und für eine 24-Well Platte 80 µl Lysispuffer. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber sorgfältig abgekratzt und anschließend in ein Reaktionsgefäß überführt, welches vorher auf  $-20^\circ\text{C}$  gekühlt wurde. Zum Homogenisieren erfolgte ein 8-maliges Auf- und Abziehen mit einer 1 ml Tuberkulinspritze mit 26 G Kanüle. Es schloss sich eine Zentrifugation über 10 min bei  $4^\circ\text{C}$  und  $16.000 \times g$  an. Der Überstand wurde in ein neues, auf  $-20^\circ\text{C}$  gekühltes Reaktionsgefäß transferiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lysate wurden bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Für Lysate, die für eine Immunpräzipitation eingesetzt wurden, wurde Gold-Lyse-Puffer oder Kloog-Puffer verwendet, da durch diese Puffer vorhandene schwache Interaktionen stabilisiert und nachgewiesen werden konnten. Für Lysate zum Proteinnachweis mittels Western-Blot wurde NOP-Puffer oder RIPA-Puffer verwendet.

#### **Protease-Inhibitor-Mix $1 \times$**

1 mM Pefabloc

1 µM Aprotinin

2,1 µM Leupeptin

2,5 µM Trypsin Inhibitor Sojabohne

pH 7,2

**Kloog-Puffer 1 × (Shalom-Feuerstein et al., 2008)**

50 mM Tris  
20 mM MgCl<sub>2</sub>  
200 mM NaCl  
0,5 % (V/V) NP-40  
1 mM DTT  
0,05 % (M/V) Na-Deoxycholat  
pH 7,6

**Gold-Lyse-Puffer 1 ×**

20 mM Tris  
50 mM NaCl  
10 % (V/V) Glyzerin  
1 % (V/V) Triton x-100  
0,05 % (M/V) Na-Deoxycholat  
pH 7,9

**NOP-Puffer 1 ×**

10 mM Tris  
150 mM NaCl  
1 % (V/V) NP40  
0,5 % (V/V) Triton x-100  
pH 7,4

**RIPA-Puffer 1 ×**

50 mM Tris  
150 mM NaCl  
0,5 % (M/V) Na-Deoxycholat  
1 % (V/V) Triton x-100  
0,1 % (M/V) SDS

**3.1.8 Membran-Cytosol-Präparation**

Die Präparation erfolgte auf Eis. Zwei konfluent bewachsene 100 mm Schalen wurden 2-mal mit eiskaltem 1 × CMF-PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 300 µl 1 × HEPES-Puffer pro Schale, welcher mit 1 × Protease-Inhibitor-Mix versetzt

wurde, lysiert. Es folgte ein 3-maliges Homogenisieren mit einer 1 ml Tuberkulinspritze mit 26 G Kanüle. Durch eine Zentrifugation bei 4 °C für 2 min und bei 600 × g setzen sich die Zellkerne als Sediment ab und der Überstand wurde in ein Ultrazentrifugengefäß überführt. Es erfolgte eine Ultrazentrifugation bei 4 °C für 45 min und 100.000 × g. Der Überstand, welcher der cytosolhaltigen Fraktion entspricht, wurde abgenommen. Restliche cytosolische Proteine wurden durch 2-maliges Waschen des Sediments mit je 250 µl 1 × HEPES-Puffer und erneuter Ultrazentrifugation bei 4 °C für je 15 min und bei 100.000 × g entfernt. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment, welches die membranhaltige Fraktion darstellt, in 120 µl 1 × RIPA-Puffer aufgenommen und mit Hilfe eines Pistills resuspendiert.

**HEPES-Puffer 1 ×**

50 mM HEPES

8,6 % (M/V) Saccharose

10 mM EDTA

10 mM EGTA

pH 7,6 bei 4 °C

**3.1.9 Proteinbestimmung**

Zur Proteinbestimmung wurde der Bicinchoninsäure-Assay benutzt. Hierbei wurden durch Proteine zweiwertige Kupferionen zu einwertigen Kupferionen quantitativ reduziert. Die einwertigen Kupferionen reagierten mit Bicinchoninsäure zu einem violetten Produkt. Die Absorption des Produktes konnte bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch gemessen werden. Als erstes wurde eine Standardreihe pipettiert, welche aus Doppelwerten bestand. Aus den Absorptionswerten der Standardreihe konnte eine Eichgerade berechnet und mit Hilfe dieser Gerade die unbekannten Proteinmengen bestimmt werden. Hierzu wurden je 20 µl, 18 µl, 16 µl, 14 µl, 12 µl, 10 µl, 7,5 µl ultrareines Wasser in ein Well einer 96-Well Platte pipettiert, wozu je 0 µl, 2 µl, 4 µl, 6 µl, 8 µl, 10 µl, 12,5 µl BSA-Proteinlösung (2 mg/ml) pipettiert wurde, sodass sich ein Gesamtvolumen von 20 µl ergab. Die zu analysierenden Proteinproben wurden 1:10 in ultrareinem Wasser verdünnt und je 40 µl als Doppelansatz in eine 96-Well Platte pipettiert. Es erfolgte die Zugabe von 180 µl Färbelösung pro Well, welche aus 50 Teilen *Pierce BCA Protein Assay Reagent A*

(Thermo Scientific, Dreieich) und einem Teil 4 % (M/V) Kupfer(II)-Sulfat-Lösung bestand. Die Platte wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert und der stattgefunden Farbumschlag von grün zu violett konnte anschließend mit dem Absorptions-Reader ELx800 gemessen werden.

### 3.1.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient dazu, Proteine allein nach ihrer Masse auftrennen zu können. Es wurden Gele mit unterschiedlichem Acrylamidgehalt verwendet. Ein Gel mit hoher Acrylamidkonzentration eignet sich zur Auftrennung von Proteinen kleinerer Molekulargewichte. Kleine Proteine laufen im Spannungsfeld der Gelelektrophorese schneller als große Proteine. Ein Gel besteht aus einem Trenn- und einem Sammelgel. Das Trenngel wurde am Tag vor der Verwendung gegossen, mit Isobutanol überschichtet und über Nacht in feuchten Tüchern eingeschlagen bei 4 °C gelagert, damit es vollständig polymerisieren konnte. Das Sammelgel wurde am Tag des Versuches gegossen und mit einem Kamm mit 10 oder 16 Taschen versehen. In der Regel wurden Galektine in 12,5 %-igen und Catenine in 10 %-igen Gelen analysiert.

**Tabelle 10: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

	Trenngel 10 %		Trenngel 12,5 %		Sam- melgel
	2 Gele	Gieß- ständer	2 Gele	Gieß- ständer	2 Gele
<b>30 % (M/V) Acrylamid</b>	2,6 ml	13 ml	3,25 ml	16,5 ml	0,38 ml
<b>2 % (M/V) Bisacrylamid</b>	1 ml	5 ml	1,2 ml	6 ml	0,16 ml
<b>3 M Tris pH 8,8</b>	1 ml	5 ml	1 ml	5 ml	-
<b>1 M Tris pH 6,8</b>	-	-	-	-	0,38 ml
<b>10 % SDS</b>	0,08 ml	0,4 ml	0,08 ml	0,4 ml	0,03 ml
<b>60 % (M/V) Saccharose</b>	-	-	-	-	0,75 ml
<b>ultrareines H<sub>2</sub>O</b>	3,2 ml	16,5 ml	2,45 ml	12,25 ml	1.3 ml
<b>TEMED</b>	8 µl	40 µl	8 µl	40 µl	4 µl
<b>10 % (M/V) APS</b>	50 µl	250 µl	50 µl	250 µl	40 µl
<b>Trennbereich</b>	120-40 kDa		80-20 kDa		-

Proteinproben wurden vorbereitet, indem 30 µg oder 50 µg des Lysates mit 5 × SDS-Probenpuffer versetzt wurden, um sie zu beschweren. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 95 °C aufgeköcht, was zur Denaturierung der Proteine führt. Die Gele wurden an der Gellaufkammer befestigt, mit 1 × SDS-Laufpuffer überschichtet und die Taschen von restlichem Acrylamid befreit. Anschließend konnten die Proben mit Hilfe einer 50 µl Hamiltonspritze (Hamilton Bonaduz, Bonaduz, Schweiz) in die Taschen des Sammelgels aufgetragen werden. Zum weiteren Einlaufen der Proben in das Sammelgel wurde für 15 min eine Spannung von 80 V angelegt. Für weitere 1-1,5 h wurde bis zum Verlassen der Laufront aus dem Gel eine Spannung von 110 V verwendet.

**SDS-Probenpuffer 5 ×**

0,2 M Tris  
1 M Saccharose  
5 mM EDTA  
1 mM DTT  
2 % (M/V) SDS  
0,1 % (M/V) Bromphenolblau  
pH 8,8

**SDS-Laufpuffer 1 ×**

50 mM Tris  
0,5 M Glyzin  
0,1 % (M/V) SDS

**3.1.11 Coomassie-Färbung**

Durch die Coomassie-Färbung können Proteine im Acrylamidgel blau gefärbt werden. Das Gel wurde hierfür in Coomassie-Färbelösung eingelegt und über Nacht bei Raumtemperatur auf einer Wippe gefärbt. Am nächsten Tag wurde das Gel für mehrere Stunden in Coomassie-Entfärbelösung eingelegt. Dort verblieb das Gel bis sich der Hintergrund vollständig entfärbt hatte und nur noch die Proteinbanden blau gefärbt waren.



**Coomassie-Färbelösung**

0,025 % (M/V) Coomassie Brilliant Blue R

10 % (V/V) Essigsäure

25 % (V/V) Isopropanol

**Coomassie-Entfärbelösung**

10 % (V/V) Essigsäure

12,5 % (V/V) Isopropanol

**3.1.12 Western-Blot**

Um die Proteine aus dem Acrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran zu übertragen, wurde das Tank-Blot-Verfahren verwendet. Schwammtücher wurden vor dem Zusammenbau in Transferpuffer getränkt, das Gel in Transferpuffer und die Membran in ultrareines Wasser eingelegt. Der Blot wurde so zusammengesetzt, dass die Anordnung der Einzelteile im Kunststoffgitter immer dieselbe war. An der Anodenseite lagen als erstes Schwammtücher, es folgten in Richtung Kathode ein Whatman Papier, die Nitrocellulosemembran, das Gel, ein weiteres Whatman Papier und an der Kathodenseite befanden sich ebenfalls Schwammtücher. Es war darauf zu achten, dass sich zwischen Nitrocellulosemembran und Gel keine Luftblasen befanden, um einen optimalen Transfer garantieren zu können. Nun wurde das Kunststoffgitter in die Blotkammer gehängt und mit Transferpuffer überschichtet. Die Transferzeit für Catenine betrug 3 h bei 60 V und für Galektine 45 min bei 70 V.

**Transferpuffer**

25 mM Tris

1,5 % (M/V) Glycin

0,1 % (M/V) SDS

20 % (V/V) Methanol

**3.1.13 Ponceau-S-Färbung**

Die Ponceau-S-Färbung dient dazu, den Erfolg des Transfers zu überprüfen, denn durch die Ponceau-S-Lösung werden Proteine auf der Nitrocellulosemembran rot gefärbt. Die Membran wurde nach dem Transfer kurz in ultrareinem Wasser eingelegt, um die Reste des Transferpuffers abzuspülen. Jetzt konnte die Membran für wenige Minuten in Ponceau-S-Lösung gelegt werden. Die Membran wurde mit ultrareinem Wasser

abgespült, die Molekulargewichtsstandards eingezeichnet und die Membran eingescannt. Bis zur vollständigen Entfärbung wurde die Membran in 1 × TBS auf einer Wippe inkubiert.

#### **Ponceau-S-Lösung**

0,2 % (M/V) Ponceau-S

3 % (M/V) Trichloressigsäure (TCA)

#### **3.1.14 Proteinnachweis durch spezifische Antikörper**

Bevor die gewünschten Proteine durch spezifische Antikörper dargestellt werden konnten, musste die Membran abgesättigt werden, um unspezifische Adhäsionen zu vermeiden. Die Sättigung der Membran mit 5 % Milchpulver in TBS-T erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln. Sollten Galektine nachgewiesen werden, wurde mit 2 % *ECL Blocking Agent* in TBS geblockt. Sollte K-Ras nachgewiesen werden, wurde mit 3 % BSA in frisch angesetzttem TBS-T geblockt. Danach wurde der 1. Antikörper (Tabelle 1) auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran insgesamt 3 × für je 5 min unter leichtem Schütteln gewaschen, um alle Reste des Primärantikörpers zu entfernen. Der erste Waschschrift erfolgte mit TBS-T, der zweite und dritte mit TBS. Der Blot wurde für 1 h mit einem 2. Antikörper (Tabelle 2), der sich gegen den 1. Antikörper richtet und entweder HRP- oder fluoreszenzgekoppelt ist, auf einer Wippe inkubiert. Nicht-gebundener 2. Antikörper wurde durch 3-maliges Waschen, wie oben beschrieben, beseitigt. Nun konnten die Antikörperbanden sichtbar gemacht werden, indem man sich die Eigenschaften des Sekundärantikörpers zunutze machte. HRP steht für *horseradish peroxidase* und ist eine Peroxidase aus dem Meerrettich. War der 2. Antikörper HRP-gekoppelt, wurde das *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Thermo Scientific, Dreieich) benutzt. Die Membran wurde für 2 min in eine Lösung eingelegt, die 1:1 aus *Luminol/Enhancer-Lösung* und *Stable Peroxide-Lösung* bestand. Es fand eine chemische Reaktion statt, bei welcher Luminol verbraucht wurde und die durch Chemilumineszenz erzeugten Lichtquanten mit Hilfe des Fusion SL 3500.WL detektiert werden konnten. War der 2. Antikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff im Infrarotbereich gekoppelt, konnten die Antikörperbanden mit Hilfe des Infrarotlaserscanners LI-COR Odyssey Sa sichtbar gemacht werden. Es

konnten aufgrund der verschiedenen Wellenlängen (680 nm und 800 nm) zwei verschiedene Proteine parallel nachgewiesen werden, wenn die primären Antikörper aus unterschiedlichen Spezies hervorgegangen waren.

**TBS 1 ×**

10 mm Tris  
150 mm NaCl  
pH 7,4

**TBS-T 1 ×**

10 mm Tris  
150 mm NaCl  
0,1 % (V/V) Tween 20  
pH 7,4

**3.1.15 Entfernung gebundener Antikörper von der Nitrocellulosemembran**

Die Entfernung gebundener Antikörper dient dazu, bereits gefärbte Membranen erneut mit einer anderen Antikörperkombination analysieren zu können. Die Membran wurde 2-mal für 5 min in Elutionspuffer eingelegt und währenddessen stark geschwenkt. Es folgte ein 2-maliges Waschen mit ultrareinem Wasser und ein 1-maliges Waschen mit 1 × TBS für jeweils 10 min. Zuletzt wurde die Membran erneut geblockt und stand zur Inkubation mit dem neuen Primärantikörper bereit.

**Entfernungspuffer**

0,2 M Glyzin  
0,5 M NaCl  
pH 2,8

**3.1.16 Immunpräzipitation**

Die Immunpräzipitation dient dazu, ein bestimmtes Protein aus einem Zelllysat anzureichern und mögliche Interaktionspartner dieses Proteins zu identifizieren. In der Regel wurde, wenn nicht anders beschrieben, zur Untersuchung einer Interaktion von Galektin-3 mit einem Catenin zur Zelllysatherstellung Kloog-Puffer und zur Analyse einer Interaktion von Galektin-8 mit einem Catenin Gold-Lyse-Puffer verwendet.

### 3.1.16.1 Immunpräzipitation mit Agarose *Beads*

Als erstes wurde der spezifische Antikörper, der sich gegen das Protein von Interesse richtet, an *Beads* gekoppelt. Verwendet wurden *EZview Red Protein A Affinity Gel* (Sigma-Aldrich, Taufkirchen), *EZview Red Protein G Affinity Gel* (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) und *Protein G Agarose Beads* (Roche, Mannheim). Als Negativkontrolle diente ein Ansatz mit einem unspezifischen Antikörper. Hierzu wurden anti-Kaninchen IgG (Dako, Glostrup, Dänemark), anti-Maus IgG (Dako, Glostrup, Dänemark), anti-Cadherin-11 Antikörper (Thermo Scientific, Dreieich) oder anti-Fer Antikörper (Abcam, Milton, England) verwendet. Pro IP-Ansatz wurden 30-40  $\mu\text{l}$  *Beads* und 1-2  $\mu\text{g}$  Antikörper verwendet und mit IP-Puffer auf ein Volumen von 0,5 ml aufgefüllt. Dieser erste Ansatz wurde 1 h bei Raumtemperatur über Kopf rotiert. Zur Aufreinigung des Proteinlysates wurden 0,5-3,0 mg Lysat mit 10  $\mu\text{l}$  *Beads* versetzt und auf ein Volumen von 0,5-1 ml mit dem Puffer, mit welchem das Lysat hergestellt wurde, aufgefüllt. Der Puffer wurde vorher mit 1  $\times$  Protease-Inhibitor-Mix versetzt. Dieser zweite Ansatz wurde für 30 min bei 4 °C über Kopf rotiert. Beide Ansätze wurden bei 1440  $\times$  g für 1 min zentrifugiert. Das aufgereinigte Lysat (Überstand Ansatz 2) wurde zu den an die *Beads* gekoppelten Antikörpern (Sediment Ansatz 1) gegeben. Es wurden 25  $\mu\text{l}$  des IP-Gesamtansatzes als Kontrolle entnommen. Wenn Catenine aufgereinigt werden sollten, wurde der IP-Gesamtansatz 3 h bei 4 °C über Kopf rotiert. Sollten Galektine angereichert werden, dauerte die Rotation 4 h. Nach Ablauf der Zeit erfolgte eine Zentrifugation mit 1440  $\times$  g. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment insgesamt 4-mal gewaschen, 2-mal mit IP-Puffer und 2-mal mit IP-Wasch-Puffer, um nicht gebundene Proteine zu entfernen. Für jeden Waschschrift wurden 500  $\mu\text{l}$  Puffer verwendet, bei 1440  $\times$  g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Sediment mit einer Hamilton-Spritze trocken gesaugt und in 20  $\mu\text{l}$  Laemmli-Puffer eluiert. Anschließend konnten die IP, die 25  $\mu\text{l}$  des IP-Gesamtansatzes und 50  $\mu\text{g}$  des verwendeten Lysates, ebenfalls in 60 °C warmem Laemmli-Puffer, für 5 min bei 95 °C aufgekocht und auf ein 12,5%-iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen werden.

**IP-Puffer**

50 mM Tris  
150 mM NaCl  
0,5 % (V/V) Triton x-100  
0,5 % (V/V) NP-40  
pH 7,2

**IP-Wasch-Puffer**

50 mM Tris  
200 mM NaCl  
0,5 % (V/V) Triton x-100  
1 % (V/V) NP-40  
0,1 % (M/V) Na-Deoxycholat  
pH 7,2

**Protein-Probenpuffer 4 × (Laemmli, 1970)**

62,5 mM Tris  
2 % (M/V) SDS  
10 % (V/V) Glycerol  
5 % (V/V) Mercaptoethanol  
0,2 % (M/V) Bromphenolblau  
pH 6,8

**3.1.16.2 Immunpräzipitation mit *μMACS Beads***

Es wurden *μMACS Protein G MicroBeads* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) und *μMACS Protein A MicroBeads* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) verwendet. Pro IP-Ansatz wurden 30-40  $\mu$ l ferromagnetische *Beads*, 1-2  $\mu$ g Antikörper und 100  $\mu$ l des verwendeten Lysispuffers für 30 min bei Raumtemperatur über Kopf vorinkubiert. Nach der Vorinkubation wurden pro Ansatz insgesamt 0,5-3,0 mg Lysat eingesetzt und mit Lysispuffer auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt. Kam das *μMACS GFP Isolation Kit* zum Einsatz, wurden 25  $\mu$ l ferromagnetische GFP *Beads* mit 0,75-1 mg Lysat gemischt und mit Lysispuffer auf ein Volumen von 1 ml angereichert. Es wurden 25  $\mu$ l IP-Gesamtansatz als Kontrolle entnommen. Die Inkubationsdauer betrug im Fall der IP mit Cateninen 2 h und im Fall der IP mit Galektinen 3 h bei 4 °C über Kopf Rotation. Die

MACS Separationssäulen wurden an dem MACS Separator angebracht und mit 400 µl Lysispuffer equilibriert. Der IP-Ansatz wurde auf ein Volumen von 2 ml mit Lysispuffer aufgefüllt und auf die Säulen pipettiert, die sich in einem starken magnetischen Feld befanden, sodass die ferromagnetischen *Beads* die Säulen nicht passieren konnten. Das Waschen der Säulen erfolgte 3-mal mit je 400 µl IP-Puffer, 2-mal mit Wasch-Puffer 1 und 1-mal mit Wasch-Puffer 2, um alle nicht oder unspezifisch gebundenen Proteine wegzuspülen. Eine Ausnahme stellte das Waschen der Membranfraktion dar. Hier wurde 3-mal mit IP-Puffer und 4-mal mit Wasch-Puffer 1 gewaschen. Nach dem Waschen wurden 20 µl des 95 °C heißen Elutionspuffers auf die Säulen gegeben, mit dem Ziel, die Reste des Waschpuffers zu entfernen. Der Durchfluss wurde verworfen. Zur Elution wurden 40 µl des 95 °C heißen Elutionspuffers auf die Säulen getropft und das Eluat wurde aufgefangen. Das Eluat, die 25 µl des IP-Ansatzes und 50 µg Lysat konnten nach Zugabe von 5 × SDS-Probenpuffer und Aufkochen für 5 min bei 95 °C auf ein 12,5 %-iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen werden. Im Falle einer IP mit GFP *Beads* wurde ein 10 %-iges SDS-Polyacrylamid-Gel genommen.

**Wasch-Puffer 1**

50 mM Tris  
150 mM NaCl  
1 % (V/V) NP-40  
0,5 % (M/V) Na-Deoxycholat  
0,1 % (M/V) SDS  
pH 8,0

**Wasch-Puffer 2**

20 mM Tris  
pH 7,5

**Elutionspuffer**

50 mM Tris  
50 mM DTT  
1 mM EDTA  
0,005 % (M/V) Bromphenolblau  
10 % (V/V) Glycerin  
pH 6,8

### 3.1.17 Immunhistochemische Färbungen

Um die Lokalisation von Galektinen und Cateninen in der Zelle darstellen zu können, wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Die Zellen wurden in 12-Well oder 6-Well Platten auf Deckgläsern ausgesät und erst gefärbt, wenn eine 70-90 %-ige Konfluenz erreicht war. Die folgenden Mengenangaben sind für eine 12-Well Platte bestimmt. Für eine 6-Well Platte wurde die doppelte Menge eingesetzt. Als erstes wurden die Zellen mit 1 ml  $1 \times$  CMF-PBS gewaschen und zur Fixation mit 1 ml 2 % (M/V) Paraformaldehyd (PFA) in  $1 \times$  CMF-PBS überschichtet und für 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Zellen wurden 1-mal mit  $1 \times$  TBS gewaschen und daraufhin zur Permeabilisation mit 1 ml 0,2 % Triton x-100 in TBS für 8 min inkubiert, was dazu diente, die Zellwand löchrig und somit für Antikörper durchgängig zu machen. Unspezifische Adhäsionen wurden abgesättigt, indem die Zellen mit 1 ml 3 % BSA in TBS-T inkubiert wurden. Nach 1-maligem Waschen mit TBS konnten 100  $\mu$ l des 1. Antikörpers (Tabelle 1), welcher in 0,3 % BSA in TBS verdünnt wurde, direkt auf das Deckglas getropft werden. Der 1. Antikörper verblieb 2 h in einer feuchten Kammer auf den Zellen. Nach gründlichem Absaugen und 3-maligem Waschen mit TBS konnten 200  $\mu$ l der 2. Antikörperlösung (Tabelle 3), welche ebenfalls in 0,3 % BSA in TBS angesetzt wurde, auf die Zellen pipettiert werden. Die 2. Antikörperlösung erhielt außerdem DAPI (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) zur Kerndarstellung, welches in einer Verdünnung von 1:10000 eingesetzt wurde. Ab hier sollte lichtgeschützt gearbeitet werden, um die Fluoreszenz des 2. Antikörpers zu erhalten. Nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 1 h wurde 3-mal mit TBS gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläser kurz in ultrareines Wasser eingetaucht, mit einem Tuch vorsichtig abgetupft und mit den Zellen nach unten auf einen Objektträger, auf dem sich ein Tropfen Mowiol-Lösung befand, fixiert.

#### **Mowiol-Lösung**

10 % (M/V) Mowiol 4-88

25 % (V/V) Glyzerin

50 % (V/V) 0,2 M Tris

pH 8,5

### 3.1.18 Luziferase-Assay

Mit Hilfe des Luziferase-Assays wurde die Promotoraktivität bestimmter Gene gemessen. Es wurde das *Dual-Luziferase Reporter Assay System* verwendet. Hier liegt die Besonderheit darin, dass die Aktivität von zwei Reportergenen nacheinander gemessen werden konnte. Die Reportergene kodierten für Luziferasen, welche durch eine Biolumineszenzreaktion Licht erzeugen konnten. Die Stärke der Reaktion konnte mit Hilfe eines Luminometers gemessen werden. Verwendet wurden zwei verschiedene Plasmide. Zum einen pGL3, welches für die Luziferase des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* kodiert, und zum anderen pRL-TK, welches für die Luziferase der Seefeder *Renilla reniformis* kodiert. Die Renilla-Luziferase diente als Kontrolle, um unterschiedliche Zellzahlen oder Transfektionseffizienzen ausgleichen zu können. Vor dem jeweiligen Luziferase-Gen befand sich der zu messende Promotor. Es konnte der Einfluss von ekto exprimierten oder endogenen Proteinen auf die Aktivität des Promotors bestimmt werden. Zellen wurden in einer bestimmten Zellzahl ausgesät, sodass am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 70-80 % erreicht war. Es wurde immer mit Doppelansätzen gearbeitet. Die Zellen wurden mit dem Reportergenvektor, dem Kontrollvektor und Expressionsvektoren transfiziert. Reportergenvektor und Kontrollvektor wurden in einem Verhältnis von 10:1 verwendet. Diese machten 1/3 der gesamten DNA-Menge aus und die restlichen 2/3 bestanden aus Expressionsvektoren. Zur Messung des unspezifischen Hintergrundes wurde ein Ansatz nur mit Expressionsvektoren transfiziert, ohne pGL3 oder pRL-TK zu transfizieren. Ein weiterer Ansatz zur Bestimmung der Grundaktivität der Zellen ohne Manipulation wurde mit dem leeren Expressionsvektor pcDNA3.1, bei paralleler Transfektion von pGL3 und pRL-TK, transfiziert. Die Zellen wurden 24-48 h nach der Transfektion mit  $1 \times$  *Passive Lysis Buffer* lysiert, indem der Puffer auf die Zellen pipettiert und die Zellen anschließend 5 min auf Eis geschüttelt wurden. Nach Überführung in ein Reaktionsgefäß fand eine 1-minütige Zentrifugation bei  $16.000 \times g$  statt. 40  $\mu$ l des Überstandes wurden in eine schwarze 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert und die Lumineszenz, unter Verwendung des *Dual-Luziferase Reporter Assay System Kits* nach Herstellerangaben, am Centro xS<sup>3</sup> LB 960 Luminometer gemessen. Der unspezifische Hintergrund wurde von der Firefly- sowie der Renilla-Luziferaseaktivität subtrahiert. Die



Berechnung der relativen Luziferaseaktivität erfolgte durch Normalisierung der Firefly-Luziferaseaktivität auf die Renilla-Luziferaseaktivität. Die relative Luziferaseaktivität wurde auf pcDNA3.1 normiert, was bedeutet, dass die Aktivität bei Transfektion mit dem leeren Expressionsvektor pcDNA3.1 gleich eins gesetzt wurde.

### 3.1.19 Statistik

Alle Experimente wurden mindestens 3-mal und unabhängig voneinander durchgeführt. Die Abbildungen wurden repräsentativ ausgewählt. Im Falle der Luziferase-Assays wurden der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (SD) berechnet.

## 3.2 Mikrobiologische Methoden

### 3.2.1 Transformation

Durch die Transformation soll erreicht werden, dass kompetente Bakterienzellen (*TOP10 E. coli*) Plasmid-DNA aufnehmen. Hierzu mussten pro Ansatz 200 µl kompetente Zellen, die bei -80°C gelagert wurden, auf Eis aufgetaut werden. Dazu wurde 0,05-0,1 µg des gewünschten Plasmids gegeben und anschließend mit 100 µl TCM-Puffer versetzt. Der Ansatz inkubierte 30 min auf Eis. Nach einem Hitzeschock für 1 min bei 42 °C wurde der Ansatz für 1 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 700 µl LB-Medium, welches Raumtemperatur hatte, erfolgte eine Inkubation für 45 min bei 37 °C und 600-700 rpm. Es fand ein Ausstreichen von 150 µl des Ansatzes mit Hilfe eines Drygalsky-Spatels auf eine LB-Agarplatte, die mit einem Antibiotikum versetzt war, statt. In Verwendung waren Platten, die mit Ampicillin (Roth, Karlsruhe) in einer Endkonzentration von 100 mg/ml oder Kanamycin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) in einer Endkonzentration von 50 mg/ml versetzt waren. Das Plasmid besaß ein Resistenzgen gegen das jeweilige Antibiotikum, sodass auf der Platte nur Bakterien wachsen konnten, die das Plasmid aufgenommen hatten. Die Platten inkubierten über Nacht bei 37 °C.

#### TCM Puffer

10 mM Tris

10 mM CaCl<sub>2</sub>

10 mM MgCl<sub>2</sub>

pH 7,5

**LB-Medium** (MP Biomedicals, Eschwege)

1 % Trypton (M/V)

0,5 % Hefeextrakt (M/V)

1 % NaCl (M/V)

**LB-Agar Medium** (Qbiogene, Heidelberg)

1 % Trypton (M/V)

0,5 % Hefeextrakt (M/V)

1 % NaCl (M/V)

1,5 % Agar-B (M/V)

**3.2.2 Animpfen der Bakterienklone**

Nachdem über Nacht auf der LB-Agarplatte Bakterienkolonien gewachsen waren, konnte eine davon mit einer sterilen Pipettenspitze von der Platte abgekratzt und in ein Reagenzglas mit 5 ml LB-Medium, welches je nach Resistenz entweder mit 100 mg/ml Ampicillin oder 50 mg/ml Kanamycin versetzt war, überführt werden. Diese Kultur wurde über Nacht bei 37 °C unter Schütteln bei 180 rpm im Bakterenschüttler MaxQ400 inkubiert. Um ein größeres Volumen der Bakterienkultur zu erhalten, wurden 1 l-Erlenmeyerkolben verwendet. In diese wurden 100 ml LB-Medium, mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt, gefüllt und 2 ml der jeweiligen Bakterienkultur zugegeben. Die Erlenmeyerkolben wurden in den Bakterenschüttler MaxQ400 eingespannt und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert.

**3.2.3 Isolierung der Plasmid-DNA**

Um die Plasmid-DNA aus den *E. coli* Bakterienzellen zu gewinnen, wurde das *DNA-spin Plasmid DNA Purification Kit* und das *NucleoBond Finalizer Kit* nach Anleitung des Herstellers benutzt. Die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe des Nano-Drop ND-1000 Spektrophotometer bei 280 nm gemessen.

**3.2.4 DNA-Verdau**

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen konnte Plasmid-DNA an einer für das Restriktionsenzym spezifischen Stelle geschnitten werden. Der Restriktionsansatz bestand aus 0,5 µg des Plasmides, 0,5 µl des Restriktionsenzym und 1 µl des dazugehörigen 10 × Puffers. Der Ansatz wurde mit ultrareinem Wasser auf ein

Endvolumen von 10 µl aufgefüllt und für 1 h bei 37 °C inkubiert, um den Verdau zu ermöglichen.

### 3.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA-Fragmente wurden in einem 1 %-igen Agarosegel der Größe nach aufgetrennt. Die Agarose (VWR Life Science Competence Center, Erlangen) wurde abgewogen, mit der entsprechenden Menge 1 × TAE-Puffer versehen, in einer Mikrowelle 2-mal zum Aufkochen gebracht und so lange geschwenkt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Nach Abkühlen auf ca. 50 °C wurde Midori Green Advance (Biozym, Hessisch Oldendorf) in einer Endkonzentration von 0,004 % hinzugefügt und die Lösung in einen Gelschlitten gegossen. Es wurde ein Kamm eingefügt, alle Luftblasen wurden entfernt und es wurde mindestens 30 min gewartet, bis das Gel polymerisiert war. Der Gelschlitten konnte in die Elektrophoresekammer eingesetzt und mit 1 × TAE-Puffer überspült werden. Nach Ziehen des Kammes konnten die Proben, die zuvor mit 10 × Gelladepuffer versetzt wurden, aufgetragen werden. Es wurde für 90 min eine Spannung von 80 V angelegt. Nach Ablauf der Zeit wurden die DNA-Banden mit Hilfe des UV-Transilluminators GeneFlash sichtbar gemacht.

#### **TAE-Puffer 1 ×**

40 mM Tris  
20 mM Essigsäure  
1 mM EDTA  
pH 8,0

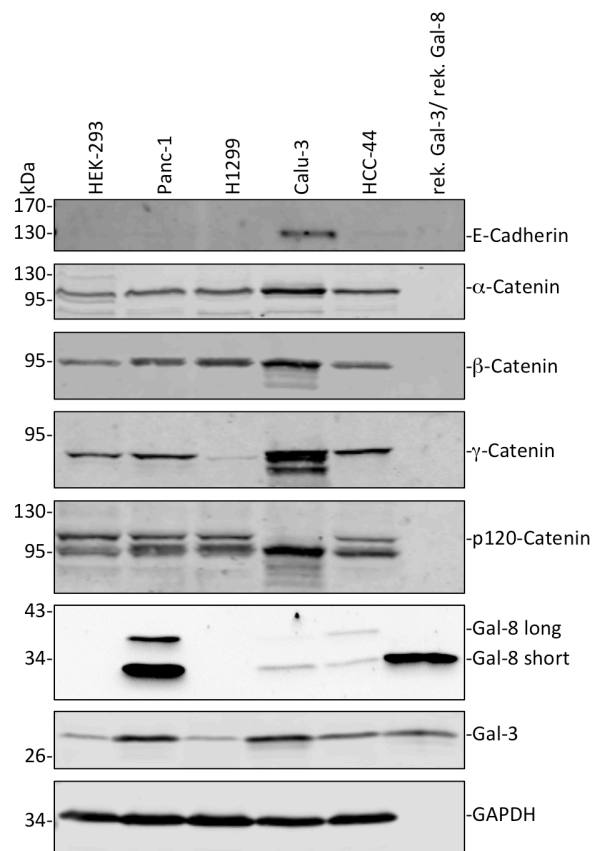
#### **Gelladepuffer 10 ×**

0,25 % (M/V) Orange G  
50 % (V/V) Glycerin  
1 mM EDTA

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Analyse der Expression von Cateninen und Galektinen in verschiedenen Lungen- und Pankreaskarzinomzelllinien

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die embryonale Nierenzelllinie HEK-293, die Pankreaskarzinomzelllinie Panc-1 und die NSCLC-Zelllinien H1299, Calu-3 und HCC-44 verwendet. Zunächst wurden die einzelnen Bestandteile des E-Cadherin-Catenin-Komplexes und die Expression von Galektin-3 und -8 in diesen Zelllinien auf Proteinebene mittels Western-Blot untersucht (Abbildung 4.1).



**Abbildung 4.1: Nachweis von Cateninen und Galektinen in verschiedenen Lungen- und Pankreaskarzinomzelllinien.** E-Cadherin lässt sich in Calu-3 und in sehr geringer Menge in HCC-44 nachweisen. α-Catenin, β-Catenin, γ-Catenin und p120-Catenin werden von allen untersuchten Zelllinien exprimiert. Die Expressionsstärke von α- und β-Catenin ist in Calu-3 im Vergleich zu den anderen untersuchten Zelllinien am größten und in HEK-293 am geringsten. Die restlichen Zelllinien exprimieren vergleichbare mittlere Mengen an α- und β-Catenin. γ-Catenin wird am stärksten von Calu-3 und am schwächsten von H1299 exprimiert. Es werden zwei Isoformen des p120-Catenin in vergleichbarer Menge in HEK-293, Panc-1, H1299 und HCC-44 exprimiert. In Calu-3 lässt sich nur eine Isoform des p120-Catenins in großer Menge nachweisen. Panc-1 besitzt eine verhältnismäßig große Menge an endogenem Gal-8 short und Gal-8 long, Calu-3 und HCC-44 exprimieren geringere Mengen Gal-8, während in HEK-293 und H1299 kein Gal-8 Nachweis möglich ist. Gal-3 wird am stärksten in Calu-3 und Panc-1 exprimiert und am schwächsten in HEK-293 und H1299. Pro Zelllinie wurden 50 µg Lysat eingesetzt. Es wurden 80 ng rek. Gal-8 und 8 ng rek. Gal-3 verwendet. Als Beladungskontrolle dient der Nachweis von GAPDH. Abkürzungen: Gal: Galektin, GAPDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, kDa: Kilodalton, rek.: rekombinant

Das Transmembranprotein E-Cadherin hat ein Molekulargewicht von ca. 120 kDa.  $\beta$ - und  $\gamma$ -Catenin binden direkt an den cytoplasmatischen Teil von E-Cadherin. E-Cadherin wird von der Zelllinie Calu-3 und in geringer Menge von HCC-44-Zellen exprimiert. In den Zelllinien HEK-293, Panc-1 und H1299 war kein E-Cadherin Nachweis möglich.

$\alpha$ -Catenin mit einem Molekulargewicht von etwa 102 kDa wird von der Zelllinie Calu-3 in großer Menge, von den Zelllinien Panc-1, H1299 und HCC-44 in mittlerer Menge und von der Zelllinie HEK-293 in sehr geringer Menge exprimiert.

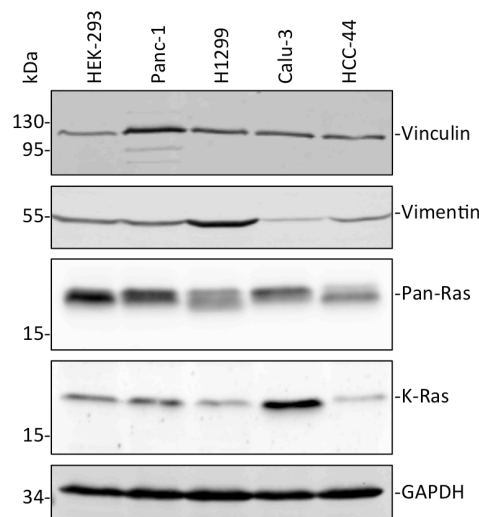
Der Nachweis von  $\beta$ -Catenin im Western-Blot mittels spezifischer Antikörper resultiert in einer Bande auf Höhe von ca. 94 kDa.  $\beta$ -Catenin wird von Calu-3-Zellen stärker exprimiert als von Panc-1- und H1299-Zellen. Die geringsten Mengen von  $\beta$ -Catenin werden in HEK-293 und HCC-44-Zellen detektiert.

$\gamma$ -Catenin hat ein Molekulargewicht von ca. 82 kDa und wird von den Zelllinien HEK-293, Panc-1 und HCC-44 in vergleichbarer Menge exprimiert. Im Vergleich dazu wird von der Zelllinie Calu-3 mehr und von H1299-Zellen weniger  $\gamma$ -Catenin exprimiert. Durch alternatives Spleißen existieren verschiedene Isoformen des p120-Catenins, welche ein Molekulargewicht zwischen 90 und 120 kDa besitzen. Die Zelllinien HEK-293, Panc-1, H1299 und HCC-44 exprimieren vergleichbare Mengen zweier Isoformen des p120-Catenins. Die eine Isoform zeichnet sich durch eine Bande bei ca. 95 kDa und die andere Isoform durch eine Bande bei ca. 100 kDa aus. In der Zelllinie Calu-3 lässt sich nur eine Isoform des p120-Catenins mit einem Molekulargewicht von ca. 95 kDa in größerer Menge nachweisen.

Es wurden die verwendeten Zelllinien auf den Gehalt an endogenem Galektin-3 und Galektin-8 untersucht. Galektin-8 kann in zwei verschiedenen Isoformen nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich um Galektin-8 long, mit einem Molekulargewicht von ca. 40 kDa, und Galektin-8 short, mit einem Molekulargewicht von ca. 36 kDa. Die Zelllinie Panc-1 enthält die größte Menge an endogenem Galektin-8. In geringerer Menge wird Galektin-8 von der Zelllinie Calu-3 und in sehr geringer Menge von der Zelllinie HCC-44 exprimiert. Die Isoform Galektin-8 short wird jeweils in größerer Menge exprimiert als die Isoform Galektin-8 long. Eine Detektion von endogenem Galektin-8 ist in den Zelllinien HEK-293 und H1299 nicht möglich.

Galektin-3 lässt sich im Western-Blot durch eine Bande bei ca. 29 kDa nachweisen. Galektin-3 wird von den Zelllinien Panc-1 und Calu-3 in großer Menge und in geringerer Menge von der Zelllinie HCC-44 exprimiert. Die Zelllinien HEK-293 und H1299 exprimieren die niedrigsten Mengen an Galektin-3. Um zu zeigen, dass die Antikörper spezifisch das jeweilige Galektin erkennen, wurde rekombinantes Galektin-3 bzw. Galektin-8 short im Western-Blot mit aufgetragen. Es fällt auf, dass die Zelllinien HEK-293 und H1299, die kein endogenes Galektin-8 besitzen, die geringsten Mengen an Galektin-3 exprimieren. Bei Expression von Galektin-8 in den Zelllinien Panc-1, Calu-3 und HCC-44 liegt auch Galektin-3 in größeren Mengen vor.

In einem nächsten Schritt wurden die verwendeten Zelllinien auf die Expression weiterer Proteine untersucht (Abbildung 4.2). Es wurde die Expression von Vinculin, einem Protein, welches unter anderem Bestandteil der *Adherens Junctions* ist, analysiert. Zudem erfolgte der Nachweis von Vimentin, einem Bestandteil der Intermediärfilamente. Außerdem wurde Ras mit Hilfe eines Pan-Ras Antikörpers nachgewiesen, welcher alle vier Isoformen des Ras-Proteins erkennt. Da die Isoform K-Ras in der Literatur als Interaktionspartner von Galektin-3 und Galektin-8 beschrieben ist, erfolgte auch ein spezifischer Nachweis von K-Ras.



**Abbildung 4.2: Nachweis weiterer Proteine in verschiedenen Lungen- und Pankreaskarzinomzelllinien.**

Vinculin wird im Vergleich zu den anderen untersuchten Zelllinien am stärksten von Panc-1 und am geringsten von HEK-293 exprimiert. H1299-Zellen besitzen die größte Menge an Vimentin und Calu-3 die kleinste. Am meisten Ras exprimieren HEK-293- und Panc-1-Zellen. Die geringsten Mengen an Ras sind in H1299 und HCC-44 zu finden, eine mittlere Menge in Calu-3. Calu-3-Zellen exprimieren am meisten K-Ras, gefolgt von HEK-293 und Panc-1. Am wenigsten K-Ras ist in H1299 und HCC-44 vorhanden. Es wurde pro Zelllinie 50 mg Lysat verwendet. Als Beladungskontrolle dient der Nachweis von GAPDH. Diese Abbildung stellt repräsentativ die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen dar. Abkürzungen: GAPDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, kDa: Kilodalton

Vinculin besitzt ein Molekulargewicht von ca. 116 kDa und wird von den Zelllinien H1299, Calu-3 und HCC-44 in vergleichbarer Menge exprimiert. Panc-1-Zellen besitzen im Vergleich dazu eine größere Menge und HEK-293-Zellen eine kleinere Menge an Vinculin.

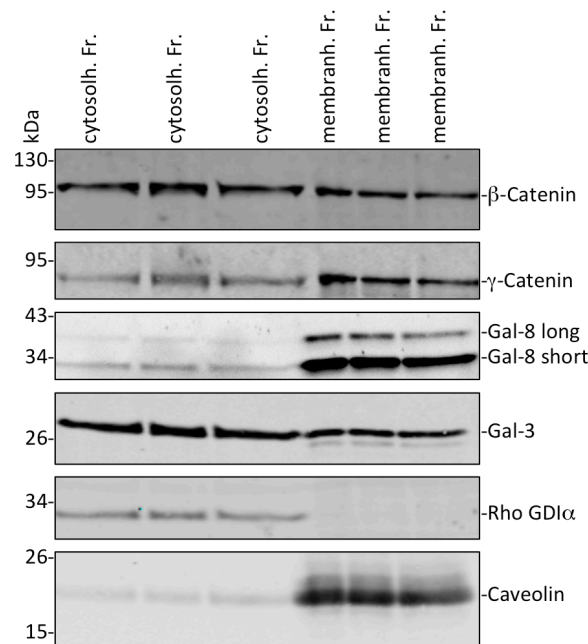
Vimentin lässt sich durch spezifische Antikörper im Western-Blot als Bande auf Höhe von etwa 57 kDa darstellen. In den Zelllinien HEK-293, Panc-1 und HCC-44 werden vergleichbare Mengen Vimentin exprimiert. In Bezug darauf enthalten H1299-Zellen mehr und Calu-3-Zellen weniger Vimentin.

Ras-Proteine besitzen ein Molekulargewicht von ca. 21 kDa. Die Zelllinien HEK-293 und Panc-1 besitzen die größten Mengen an Ras, gefolgt von Calu-3. In den Zelllinien H1299 und HCC-44 ist am wenigsten Ras vorhanden. Die Isoform K-Ras ist ein beschriebener Interaktionspartner von Galektin-3. In der Zelllinie Calu-3 lässt sich von den untersuchten Zelllinien die größte Menge der Isoform K-Ras detektieren. Die Zelllinien HEK-293 und Panc-1 exprimieren eine mittlere Menge K-Ras und die Zelllinien H1299 und HCC-44 die geringste Menge. Mit Ausnahme der Zelllinie Calu-3 korreliert in den untersuchten Zelllinien die Menge an Gesamt-Ras mit der Menge an K-Ras.

#### **4.2 Lokalisationsanalyse von Cateninen und Galektinen**

Um die Lokalisation von Cateninen und Galektinen in der Zelle zu analysieren, wurde einmal eine Membran-Cytosol-Präparation und darüber hinaus eine immunocytochemische Analyse durchgeführt.

Für die Fraktionierungsexperimente wurde die Zelllinie Panc-1 verwendet, da diese sowohl endogenes  $\beta$ - und  $\gamma$ -Catenin als auch endogenes Galektin-3 und -8 besitzt. Es wurden drei Membran-Cytosol-Fraktionierungen im Western-Blot analysiert (Abbildung 4.3). Dazu wurden je 30  $\mu$ g cytosolhaltige Fraktion und je 15  $\mu$ g membranhaltige Fraktion pro Probe eingesetzt.



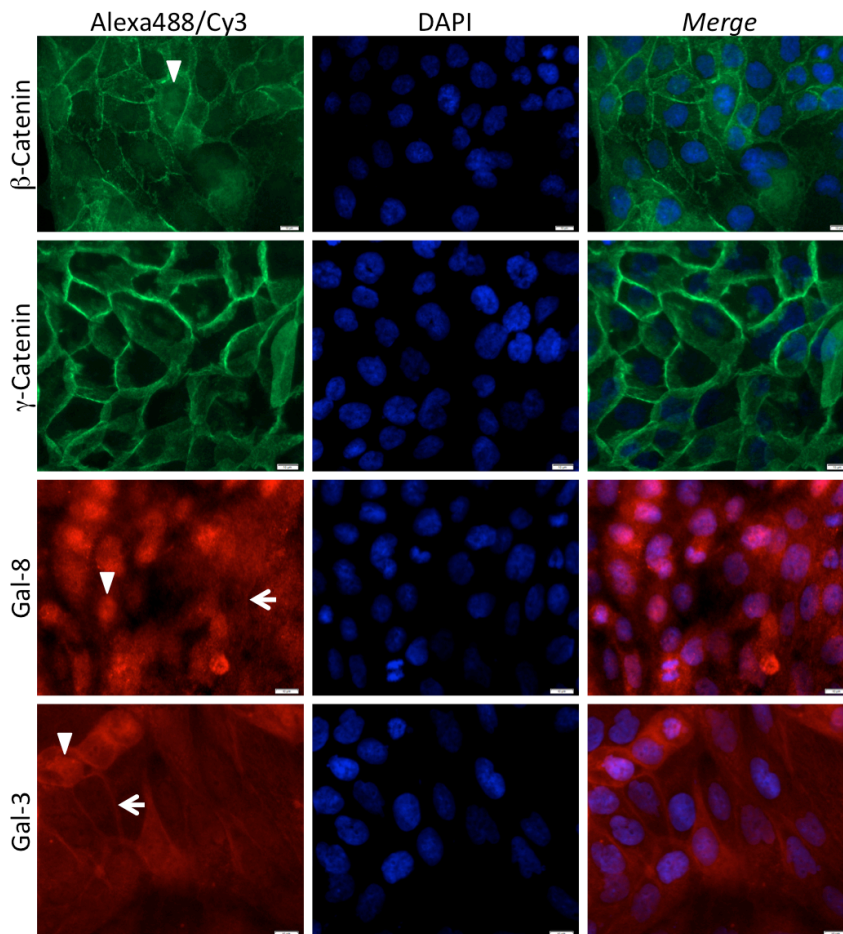
**Abbildung 4.3: Analyse der Lokalisation von Cateninen und Galektinen nach Membran-Cytosol-Präparation in der Zelllinie Panc-1.** β-Catenin lässt sich in gleichen Mengen in der cytosol- und der membranhaltigen Fraktion detektieren. γ-Catenin befindet sich in einer größeren Menge in der membran- als in der cytosolhaltigen Fraktion. Gal-8 short und Gal-8 long können hauptsächlich in der membranhaltigen Fraktion nachgewiesen werden. Gal-3 lässt sich in gleicher Menge in der cytosol- und membranhaltigen Fraktion nachweisen. Rho GDIα dient als Markerprotein für die cytosolhaltige Fraktion und Caveolin als Markerprotein für die membranhaltige Fraktion. Diese Abbildung stellt repräsentativ die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen dar. Abkürzungen: cytosolh. Fr.: cytosolhaltige Fraktion, Gal: Galektin, kDa: Kilodalton, membranh. Fr.: membranhaltige Fraktion

β-Catenin lässt sich zu gleichen Teilen in der cytosol- und der membranhaltigen Fraktion detektieren, während γ-Catenin in einer größeren Menge in der membranhaltigen Fraktion enthalten ist. Galektin-8 befindet sich hauptsächlich in der membranhaltigen Fraktion. Die Isoform Galektin-8 short wird stärker exprimiert als die Isoform Galektin-8 long. In der cytosolhaltigen Fraktion ist Galektin-8 in nur sehr geringer Menge nachzuweisen. Galektin-3 ist in der cytosol- und membranhaltigen Fraktion in vergleichbarer Menge detektierbar. Es kann in Panc-1-Zellen ein gemeinsames Vorkommen von Cateninen und Galektinen in der membranhaltigen Fraktion nachgewiesen werden. Als Methodennachweis der Fraktionierung, um die Reinheit der Fraktionen zu überprüfen, dient die Färbung mit spezifischem anti-Rho GDIα und anti-Caveolin Antikörper. Rho GDIα (30 kDa) ist ein Protein, welches ausschließlich im Cytosol vorkommt. Caveolin (22 kDa) ist ein Protein, welches sich an der Membran befindet.

Um die proteinbiochemische Lokalisation zu verifizieren, wurde die Lokalisation von Cateninen und Galektinen in der Zelle mit Hilfe der Immunhistochemie überprüft. Es



wurden die Zelllinien Calu-3 und Panc-1 verwendet, da diese Zelllinien die größte Menge an endogenem  $\beta$ - und  $\gamma$ -Catenin sowie Galektin-3 und -8 aufweisen (Abbildung 4.1).

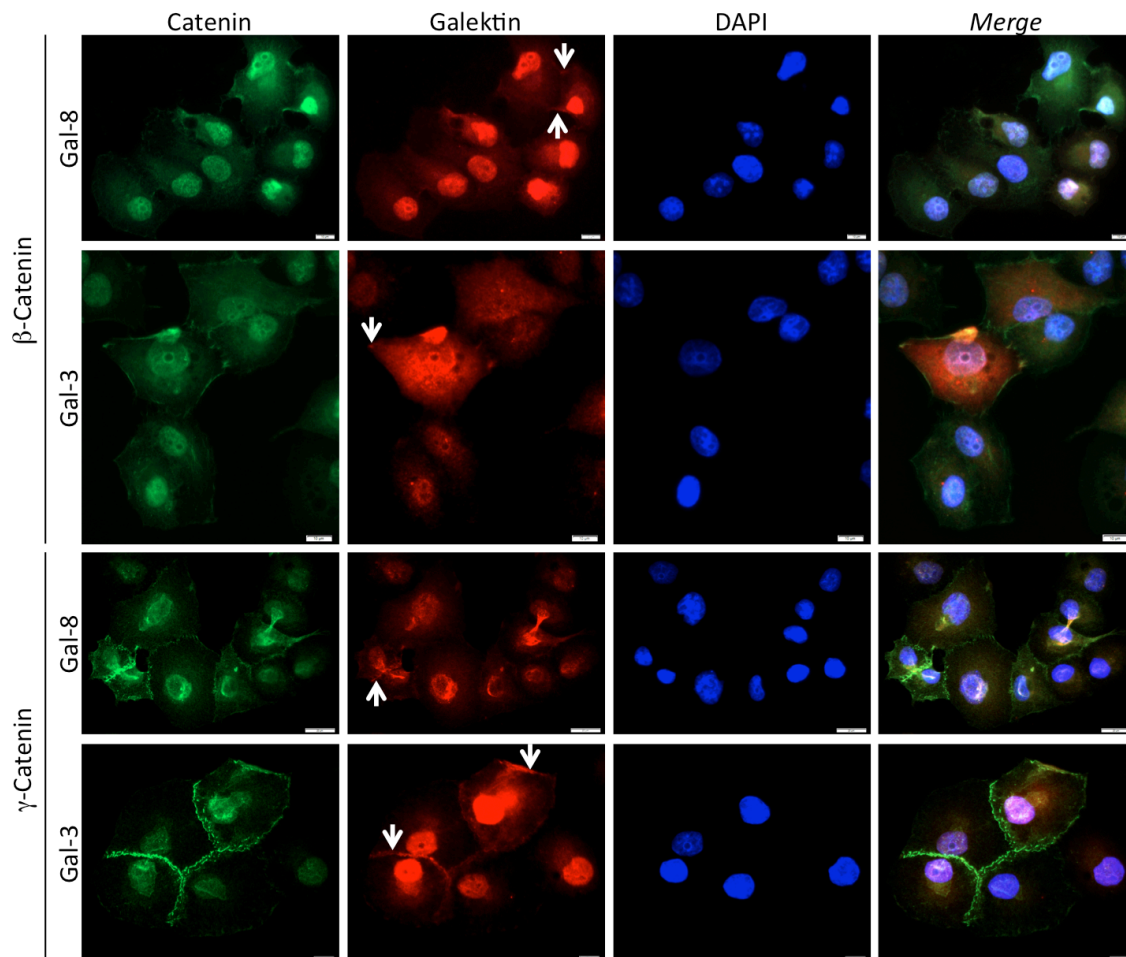


**Abbildung 4.4: Lokalisation von Cateninen und Galektinen in der Zelllinie Calu-3 mittels Immunhistochemie.**  $\beta$ -Catenin (grün) ist einerseits an der Membran im Bereich der Zell-Zell-Kontakte lokalisiert. Andererseits ist in einzelnen Zellen eine Lokalisation im Kern wahrscheinlich (weiße Pfeilspitze).  $\gamma$ -Catenin (grün) befindet sich im Bereich der Zell-Zell-Kontakte an der Membran. Gal-8 (rot) und Gal-3 (rot) lassen sich membranständig (weißer Pfeil) und im Kern (weiße Pfeilspitze) darstellen. DAPI (blau) dient der Kerndarstellung. Eine Überlagerung des ersten und zweiten Bildes einer Reihe ist in der rechten Spalte zu sehen (*Merge*). Zur Aufnahme der Bilder wurde ein 60 $\times$  Objektiv verwendet. Abkürzungen: Gal: Galektin

In Abbildung 4.4 ist die Lokalisation von  $\beta$ - und  $\gamma$ -Catenin in grün und die Lokalisation von Galektin-3 und -8 in rot in Calu-3-Zellen dargestellt.  $\beta$ -Catenin ist an der Zellmembran lokalisiert, in wenigen Zellen ist auch eine Lokalisation im Zellkern möglich (Abbildung 4.4, Pfeilspitze).  $\gamma$ -Catenin befindet sich hauptsächlich an der Zellmembran. Eine Kernlokalisation von  $\gamma$ -Catenin ist hier nicht nachweisbar. Galektin-8 ist hauptsächlich im Kern lokalisiert (Abbildung 4.4, Pfeilspitze). Möglicherweise handelt es sich hierbei jedoch um ein Fixierungsartefakt. Es gibt einzelne

Bereiche, in denen auch eine Membranlokalisation von Galektin-8 detektierbar ist (Abbildung 4.4, Pfeil). Galektin-3 ist im Zellkern (Abbildung 4.4, Pfeilspitze) und an der Zellmembran (Abbildung 4.4, Pfeil) nachzuweisen.

Um eine mögliche Kolo­kalisierung von Cateninen und Galektinen an der Zellmembran weiter zu untersuchen, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung von Panc-1-Zellen durchgeführt, bei der Catenine und Galektine in einem Präparat angefärbt wurden.



**Abbildung 4.5: Lokalisation von Cateninen und Galektinen in der Zelllinie Panc-1 mittels Immunhistochemie.**  $\beta$ - und  $\gamma$ -Catenin (beide grün) sind sowohl im Zellkern als auch an der Membran lokalisiert. Gal-8 (rot) und Gal-3 (rot) sind zum Großteil im Kern lokalisiert und zu einem geringeren Teil membranständig. Die Membranlokalisation der Galektine ist mit weißen Pfeilen gekennzeichnet. DAPI (blau) dient der Kerndarstellung. Eine Überlagerung der ersten drei Bilder einer Reihe ist in der rechten Spalte zu sehen (*Merge*). Zur Aufnahme der Bilder wurde ein 60 $\times$  Objektiv verwendet. Abkürzungen: Gal: Galektin

In Panc-1-Zellen ist  $\beta$ -Catenin primär im Zellkern und in kleinen Mengen an der Membran zu finden.  $\gamma$ -Catenin lässt sich sowohl im Kern als auch an der Membran detektieren. Galektin-3 befindet sich in den untersuchten Panc-1-Zellen sowohl im Kern als auch membranständig (Abbildung 4.5, weiße Pfeile). Galektin-8 ist zum

Großteil im Kern lokalisiert und an der Membran lassen sich nur sehr geringe Mengen Galektin-8 nachweisen (Abbildung 4.5, weiße Pfeile).

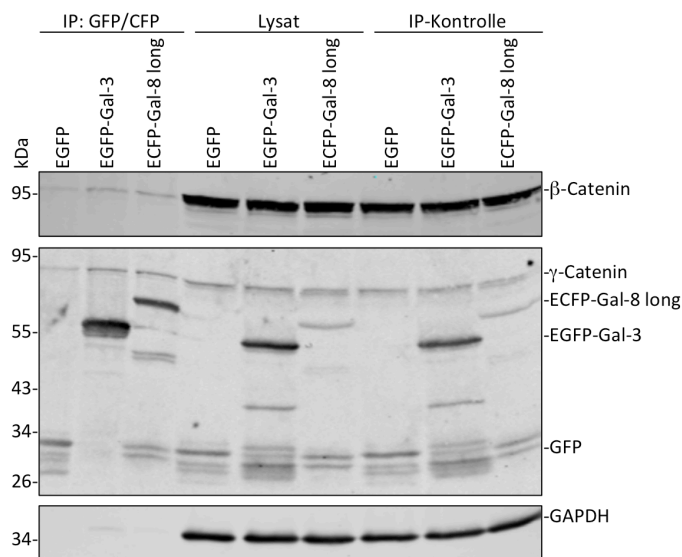
Durch die Immunfluoreszenz kann die Kolokalisation von  $\beta$ - und  $\gamma$ -Catenin und Galektin-3 und -8 an der Zellmembran bestätigt werden. Auch eine Kolokalisation der genannten Proteine im Zellkern kann experimentell belegt werden.

#### 4.3 Analyse der Interaktion von Cateninen und Galektinen durch Immunpräzipitation

Durch die Membran-Cytosol-Präparation mit anschließende Analyse mittels Western-Blot und durch Immunfluoreszenzversuche konnte eine Kolokalisation von  $\beta$ - und  $\gamma$ -Catenin sowie von Galektin-3 und -8 an der Zellmembran ausgemacht werden. In einem nächsten Schritt sollte anhand von Immunpräzipitationsstudien eine mögliche Interaktion zwischen Cateninen und Galektinen untersucht werden.

##### 4.3.1 Präzipitation von Galektinen mit Hilfe eines GFP-Tags

Zunächst wurde in der Zelllinie Panc-1 durch Präzipitation von ekto exprimiertem EGFP-Galektin-3 und ECFP-Galektin-8 long untersucht, ob Galektin-3 oder -8 mit  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Catenin interagieren (Abbildung 4.6). Als Negativkontrolle dient ein Ansatz, in dem EGFP ekto exprimiert wurde. Durch einen anti-GFP Antikörper, welcher an ferromagnetische *Beads* (Miltenyi) gebunden war, konnten die Galektine aufgrund ihres GFP/CFP-Tags präzipitiert werden.

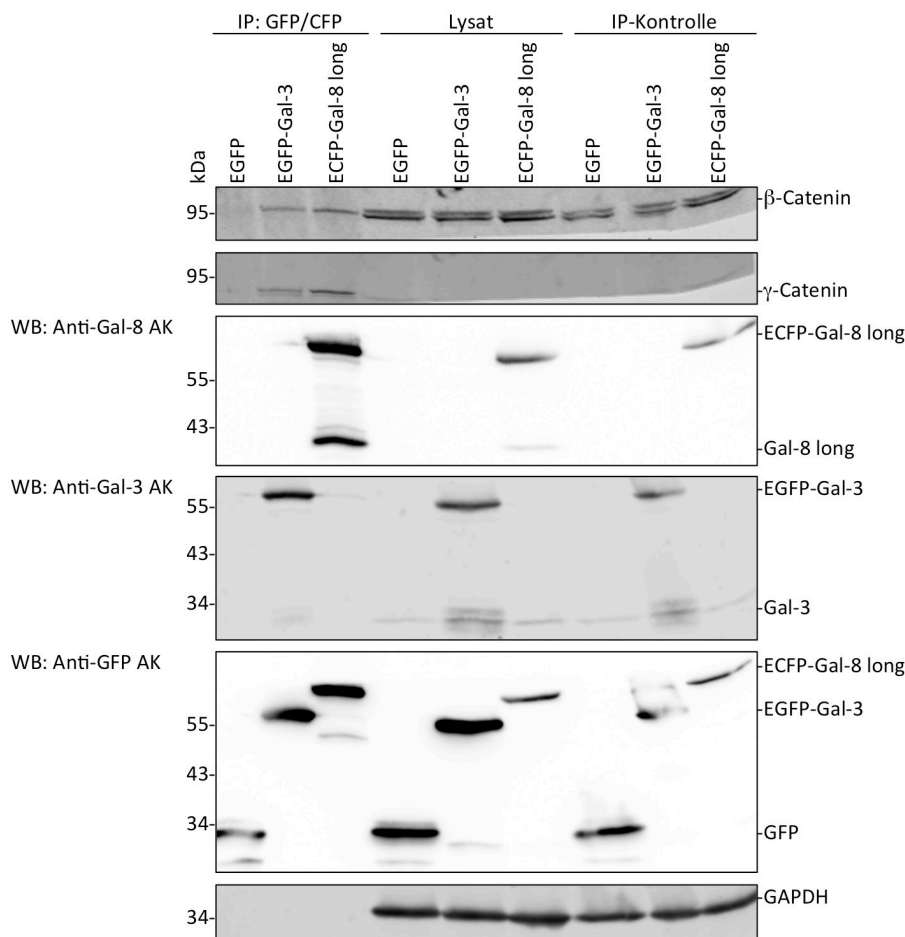


**Abbildung 4.6: Immunpräzipitation von EGFP-Galektin-3 und ECFP-Galektin-8 long in der Zelllinie Panc-1.** Pro IP-Ansatz wurde 1,0 mg Lysat eingesetzt. Präzipitiert wurde mit dem *μMACS GFP Isolation Kit*. Es wurden die Immunpräzipitationen und zur Kontrolle der eingesetzten Mengen jeweils 50  $\mu$ g Lysat und 25  $\mu$ l IP-Gesamtansatz aufgetragen. Als Kontrolle der Spezifität dient der EGFP-Ansatz. Die Immunpräzipitationen zeigen eine Anreicherung von EGFP-Gal-3 und ECFP-Gal-8 long. Die

Kopräzipitation von  $\beta$ - bzw.  $\gamma$ -Catenin stellt eine Interaktion zwischen Gal-3 und -8 mit dem jeweiligen Catenin dar. Als Beladungskontrolle dient der Nachweis von GAPDH. Diese Abbildung stellt repräsentativ die Ergebnisse von zwei unabhängigen Versuchen dar. Abkürzungen: Gal: Galektin, GAPDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, IP: Immunpräzipitation, kDa: Kilodalton

In transfizierten Panc-1-Zellen kann sowohl Galektin-3 als auch Galektin-8 long mit Hilfe ihres EGFP- bzw. ECFP-Tags präzipitiert werden. Bei Präzipitation von EGFP-Galektin-3 bzw. ECFP-Galektin-8 long konnten sowohl  $\beta$ - als auch  $\gamma$ -Catenin kopräzipitiert werden, was eine Interaktion von Galektin-3 bzw. Galektin-8 long mit  $\beta$ - und  $\gamma$ -Catenin belegt (Abbildung 4.6).

Auch in der Lungenkarzinomzelllinie H1299 wurden die Interaktion zwischen EGFP/ECFP-Galektin und Cateninen untersucht (Abbildung 4.7).

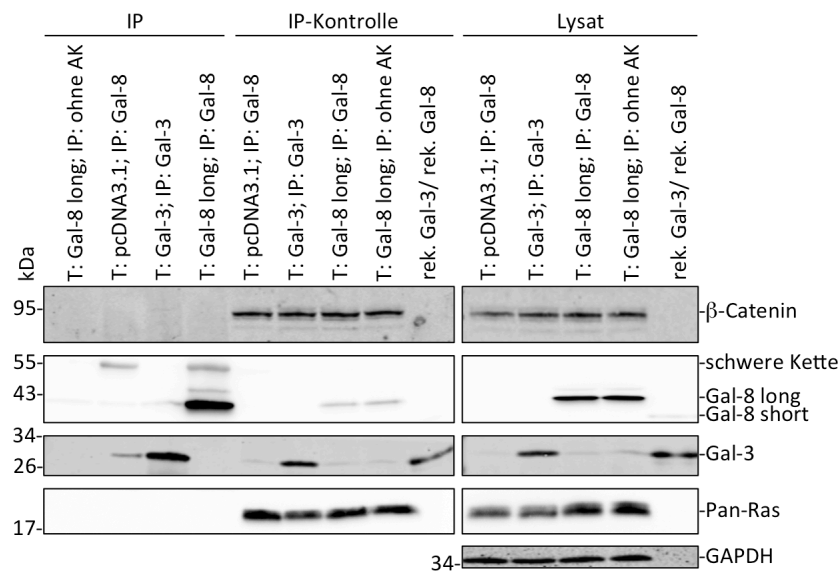


**Abbildung 4.7: Immunpräzipitation von EGFP-Galektin-3 und ECFP-Galektin-8 long in der Zelllinie H1299.** Es wurde pro IP-Ansatz 750  $\mu$ g Lysat verwendet. Als Kontrollen der verwendeten Mengen wurden 50  $\mu$ g Lysat und 25  $\mu$ l IP-Gesamtansatz aufgetragen. EGFP, EGFP-Gal-3 und ECFP-Gal-8 long wurden mit Hilfe des *GFP Isolation Kits* präzipitiert und kopräzipitiertes  $\beta$ - sowie  $\gamma$ -Catenin wurde detektiert. Die Western-Blots belegen, dass sowohl  $\beta$ - als auch  $\gamma$ -Catenin mit Gal-3 sowie mit Gal-8 interagiert. Der Nachweis von Gal-3 bzw. Gal-8 long erfolgte sowohl mit einem anti-Gal-3 Antikörper bzw. anti-Gal-8 Antikörper als auch mit einem anti-GFP Antikörper. Als Beladungskontrolle dient der Nachweis von GAPDH. Abkürzungen: AK: Antikörper, Gal: Galektin, GAPDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, IP: Immunpräzipitation, kDa: Kilodalton, WB: Western-Blot

Durch die Immunpräzipitation konnten EGFP-Galektin-3 und ECFP-Galektin-8 long mit Hilfe des *μMACS GFP Isolation Kits* angereichert und anschließend mittels Western-Blot detektiert werden. Bei der Analyse der kopräzipitierten Proteine lassen sich sowohl  $\beta$ - als auch  $\gamma$ -Catenin nachweisen. Die Kopräzipitation von  $\beta$ - und  $\gamma$ -Catenin verifiziert eine Interaktion der Catenine mit Galektin-3 und Galektin-8 (Abbildung 4.7). Bei der Präzipitation von EGFP-Gal-3 lässt sich neben einer spezifischen Proteinbande bei ca. 56 kDa im Western-Blot eine Proteinbande bei ca. 29 kDa darstellen. Bei Präzipitation von ECFP-Galektin-8 long zeigt sich im Western-Blot neben einer spezifischen Proteinbande bei ca. 67 kDa eine Proteinbande bei ca. 40 kDa. Die Bande bei ca. 29 kDa und bei ca. 40 kDa entsprechen eventuell Abbaubanden der Galektine nach Abbau des GFP- bzw. CFP-Tags.

#### 4.3.2 Präzipitation von Galektinen ohne GFP-Tag

Um einen möglichen Einfluss des fusionierten Tags auf die Bindung zwischen Galektinen und Cateninen auszuschließen, wurden Immunpräzipitationsstudien mit endogenen oder ektop exprimierten Galektin-3- und Galektin-8-Proteinen in den Zelllinien HEK-293, H1299, Panc-1 und Calu-3 durchgeführt.



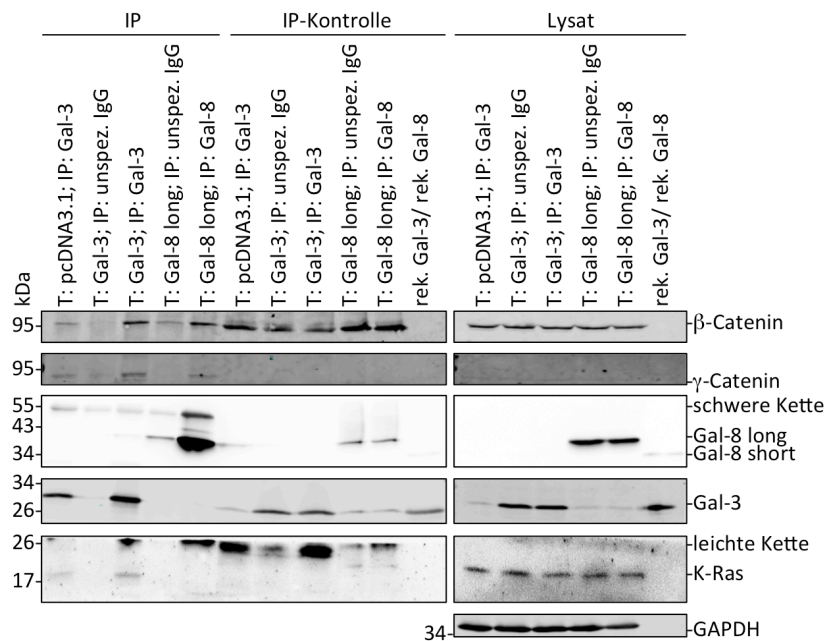
**Abbildung 4.8: Ektopy Expression und Immunpräzipitation von Galektin-3 und Galektin-8 in der Zelllinie HEK-293.** Pro IP-Ansatz wurde 750  $\mu$ g Lysat eingesetzt. Als Kontrollen der Mengen wurden 25  $\mu$ l IP-Gesamtansatz und 50  $\mu$ g Lysat aufgetragen. Gal-3 wurde mit Hilfe eines Ziege-anti-Gal-3 Antikörpers und Gal-8 mit einem Maus-anti-Gal-8 Antikörper präzipitiert. Als Negativkontrollen dienen ein Ansatz ohne Antikörper und ein Ansatz, bei welchem die Zellen mit pcDNA3.1 transfiziert und mit einem anti-Gal-8 Antikörper präzipitiert wurden. Bei Präzipitation von Gal-3 bzw. Gal-8 konnte keine Kopräzipitation von  $\beta$ -Catenin oder Ras detektiert werden. Das Lysat wurde mit dem entsprechenden Konstrukt transfiziert (T) und mit dem beschriebenen Antikörper immunpräzipitiert (IP). Als Kontrolle wurden 80 ng rek. Gal-8 und 8 ng rek. Gal-3 aufgetragen. Als Beladungskontrolle dient der Nachweis von

GAPDH. Diese Abbildung stellt repräsentativ die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen dar. Abkürzungen: AK: Antikörper, Gal: Galektin, GAPDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, IP: Immunpräzipitation, kDa: Kilodalton, rek.: rekombinant, T: transfiziert

HEK-293-Zellen exprimieren kaum endogenes Galektin-3 und kein endogenes Galektin-8 (Abbildung 4.1). Ektop exprimiertes Galektin-3 und Galektin-8 wurden mit Hilfe von anti-Gal-3 bzw. anti-Gal-8 Antikörper, gekoppelt an *EZview Red Protein G Affinity Gel*, präzipitiert. Es kann unter Verwendung von 750 µg Gesamtllysate pro Ansatz keine Interaktion von Galektin-3 oder Galektin-8 long mit  $\beta$ -Catenin nachgewiesen werden (Abbildung 4.8). Auch bei Steigerung der Gesamtlysatmenge auf 2 mg (Ergebnisse nicht gezeigt) konnte keine Interaktion von Galektinen mit  $\beta$ -Catenin nachgewiesen werden. Das Vorhandensein bzw. die Stärke der schweren Kette des Antikörpers lässt keine Rückschlüsse auf die verwendete Antikörpermenge zu, da die Antikörper unterschiedlichen Spezies entstammen.

Es wurde publiziert, dass sowohl Galektin-3 als auch Galektin-8 mit K-Ras interagieren. Um das Vorhandensein von potentiellen Interaktionspartnern nachzuweisen, erfolgte die Färbung des Western-Blots mit einem anti-Ras Antikörper. Bei der Präzipitation von Galektin-3 bzw. Galektin-8 lässt sich kein Ras kopräzipitieren und die in der Literatur beschriebene Interaktion nicht reproduzieren. Möglicherweise war die Menge an ektop exprimierten Galektinen im Gesamtlysat nicht ausreichend, um eine Interaktion darzustellen.

Nachfolgend sollten endogenes Galektin-3 und ektop exprimiertes Galektin-3 bzw. -8 in H1299-Zellen präzipitiert und anschließend auf eine Interaktion mit Cateninen untersucht werden (Abbildung 4.9). Diese Zelllinie wurde ausgewählt, da sie endogenes Galektin-3, jedoch kein endogenes Galektin-8 enthält (Abbildung 4.1).



**Abbildung 4.9: Immunpräzipitation von Galektin-3 und Galektin-8 in der Zelllinie H1299.** Für die Immunpräzipitation wurde pro Ansatz 2,0 mg Lysat eingesetzt. Als Kontrollen der Mengen dienen je 25 µl IP-Ansatz und je 50 µg Lysat. Präzipitiert wurde Gal-3 mit einem Ziege-anti-Gal-3 Antikörper und Gal-8 mit einem Maus-anti-Gal-8 Antikörper. Als Negativkontrollen dienen die Ansätze mit unspezifischem anti-Maus Antikörper. Bei Präzipitation von endogenem und ektop exprimiertem Gal-3 wird sowohl β-Catenin als auch γ-Catenin kopräzipitiert. Dasselbe gilt für die Präzipitation von ektop exprimiertem Gal-8 long. Nachgewiesen werden zudem eine Interaktion zwischen endogenem und ektop exprimiertem Gal-3 und K-Ras. Es wurden 80 ng rek. Gal-8 und 8 ng rek. Gal-3 verwendet. Als Beladungskontrolle dient der Nachweis von GAPDH. Diese Abbildung stellt repräsentativ die Ergebnisse von zwei unabhängigen Versuchen dar. Abkürzungen: Gal: Galektin, GAPDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, IP: Immunpräzipitation, kDa: Kilodalton, rek.: rekombinant, T: transfiziert

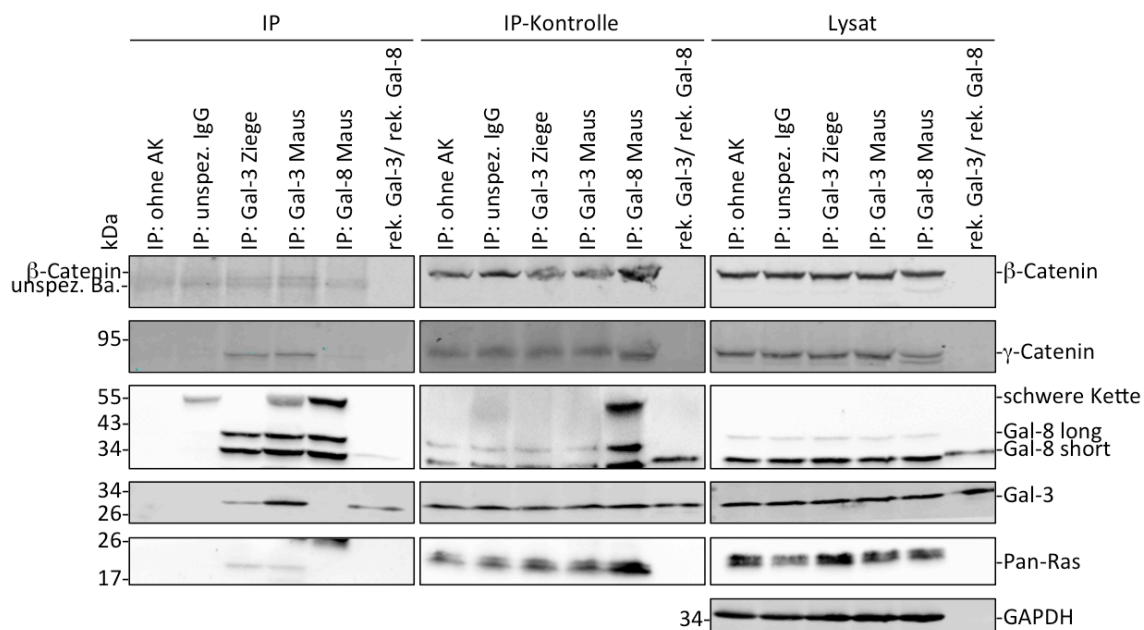
In einem ersten Ansatz wurde ausschließlich endogenes Galektin-3 präzipitiert. In einem weiteren Ansatz wurde Galektin-3 überexprimiert. Das bedeutet, es wurde zusätzlich zum endogenen Galektin-3 ektop exprimiertes Galektin-3 präzipitiert. Auch Galektin-8 wurde ektop exprimiert und in einem weiteren IP-Ansatz präzipitiert. Zur Präzipitation wurde entsprechend anti-Gal-3 und anti-Gal-8 Antikörper, gekoppelt an ferromagnetische *µMACS Protein G Beads*, verwendet. Es lassen sich Unterschiede in der Menge des präzipitierbaren Galektin-3 nachweisen. Endogenes Galektin-3 ist in der Spur zu sehen, in welcher die Zellen ausschließlich mit dem leeren Vektor pcDNA3.1 transfiziert wurden. Wenn Galektin-3 ektop exprimiert wurde, lässt sich eine größere Menge Galektin-3 detektieren, welche sich aus dem endogenen und dem ektop exprimierten Galektin-3 zusammensetzt. β- und γ-Catenin können in allen IP-Ansätzen kopräzipitiert werden, was eine Interaktion von endogenem Galektin-3, überexprimiertem Galektin-3 und ektop exprimiertem Galektin-8 long mit β-Catenin und γ-Catenin experimentell belegt (Abbildung 4.9). H1299 besitzen weniger



endogenes  $\gamma$ -Catenin als  $\beta$ -Catenin. Die Daten zeigen, dass, im Gegensatz zu  $\beta$ -Catenin, ein Großteil des zellulären  $\gamma$ -Catenin im Komplex gebunden mit Galektinen vorliegt.

Zur Überprüfung der Interaktionsbedingungen sollte der Nachweis von K-Ras erfolgen. Bei Präzipitation von Galektin-3 wird K-Ras kopräzipitiert. Mit Hilfe eines spezifischen anti-K-Ras Antikörpers kann die Interaktion von Galektin-3 und K-Ras sowohl mit dem endogenen Galektin-3 als auch mit dem überexprimierten Galektin-3 nachgewiesen werden. Nachdem Galektin-8 präzipitiert wurde, konnte kein gebundenes K-Ras detektiert werden.

Da bei Interaktionsstudien mit transfizierten Proteinen leichter Artefakte auftreten können als bei Interaktionsstudien mit endogenen Proteinen, sollte die Interaktion zwischen Galektin-3 oder Galektin-8 mit einem Catenin in Zelllinien reproduziert werden, die endogen Galektin-3 und Galektin-8 exprimieren. Hierzu wurden die Zelllinien Panc-1 und Calu-3 verwendet, da diese Zelllinien Galektin-3 und Galektin-8 sowie  $\beta$ - und  $\gamma$ -Catenin exprimieren (Abbildung 4.1).

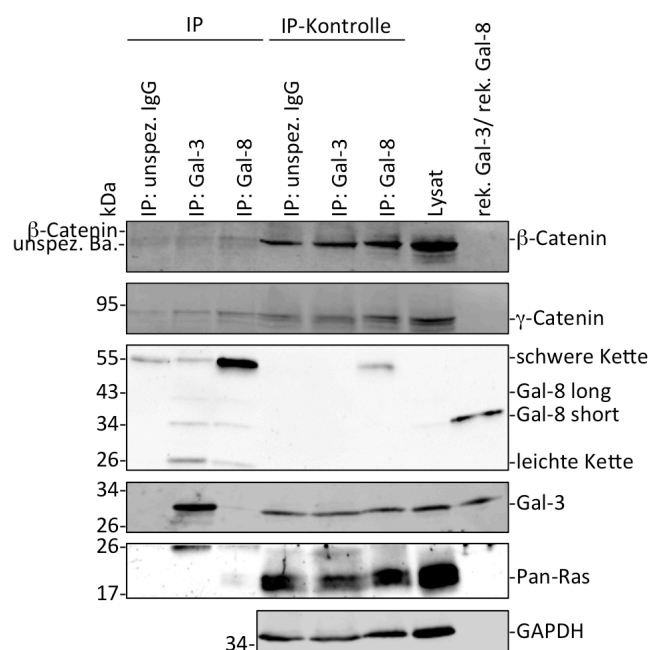


**Abbildung 4.10: Immunpräzipitation von Galektin-3 und Galektin-8 in der Zelllinie Panc-1.** Pro Ansatz wurde 1,5 mg Lysat verwendet. Als Mengenkontrollen wurden je 25  $\mu$ l IP-Ansatz und je 50  $\mu$ g Lysat aufgetragen. Die Präzipitation erfolgte mit einem Ziege-anti-Gal-3 bzw. einem Maus-anti-Gal-3 Antikörper und mit einem Maus-anti-Gal-8 Antikörper. Als Negativkontrollen dienen ein Ansatz ohne Antikörper und ein Ansatz, der mit einem unspezifischen anti-Maus Antikörper präzipitiert wurde. In den Experimenten kann eine Interaktion von Gal-3 und Gal-8 mit  $\beta$ -Catenin und  $\gamma$ -Catenin dargestellt werden. Auch eine Interaktion zwischen Gal-3 und Ras kann nachgewiesen werden. Es wurden 80 ng rek. Gal-8 und 8 ng rek. Gal-3 eingesetzt. Als Beladungskontrolle dient der Nachweis von GAPDH. Diese Abbildung stellt repräsentativ die Ergebnisse von fünf unabhängigen Versuchen dar. Abkürzungen: AK: Antikörper, Gal: Galektin, GAPDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, IP: Immunpräzipitation, kDa: Kilodalton, rek.: rekombinant, unspez. Ba.: unspezifische Bande



Aus Lysaten der Zelllinie Panc-1 wurden endogenes Galektin-3 und Galektin-8 präzipitiert. Zur Präzipitation der Galektine wurde anti-Galektin-3 oder anti-Galektin-8 Antikörper, gekoppelt an ferromagnetische *μMACS Protein G Beads*, benutzt. Die Abbildung 4.10 zeigt, dass bei der Präzipitation mit anti-Galektin-3 Antikörper auch Galektin-8 short und long präzipitiert wurden, was darauf zurückzuführen ist, dass der anti-Galektin-3 Antikörper möglicherweise auch endogenes Galektin-8 bindet. Hierbei machte es keinen Unterschied, ob der Maus-anti-Galektin-3 oder der Ziege-anti-Galektin-3 Antikörper verwendet wurde. Bei der Präzipitation von Galektin-8 kopräzipitieren geringe Mengen an  $\beta$ -Catenin und  $\gamma$ -Catenin. Bei Präzipitation von Galektin-3 kopräzipitiert eine größere Menge an  $\beta$ -Catenin und  $\gamma$ -Catenin als bei Präzipitation von Galektin-8, weshalb trotz der geringen Unspezifität des anti-Galektin-3 Antikörpers davon auszugehen ist, dass auch Galektin-3 mit  $\beta$ -Catenin und  $\gamma$ -Catenin interagiert. In der 3., 4., und 5. Spur ist eine spezifische  $\beta$ -Catenin Bande von einer darunterliegenden unspezifischen Bande zu unterscheiden. Die Bande ist auch in den Kontrollpräzipitaten ohne Antikörper (1. Spur) und mit unspezifischem Antikörper (2. Spur) vorhanden und aus diesem Grund als unspezifisch anzusehen. Es handelt sich vermutlich um eine Proteinabbauabande. In diesem Versuch ist es gelungen, die Interaktion von Galektin-3 mit Ras experimentell nachzuweisen, nicht jedoch die Interaktion von Galektin-8 mit Ras.

Im Folgenden wurden endogenes Galektin-3 und -8 in Calu-3-Zellen präzipitiert.

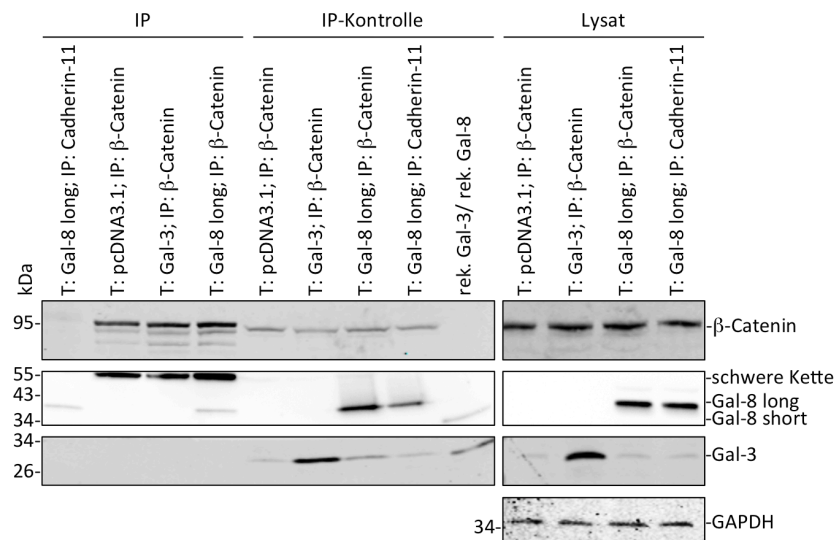


**Abbildung 4.11: Immunpräzipitation von Galektin-3 und Galektin-8 in der Zelllinie Calu-3.** Es wurde pro Ansatz 1 mg Lysat eingesetzt. Als Kontrolle dienen je 25 µl IP-Ansatz. Gal-3 wurde mit einem Maus-anti-Gal-3 Antikörper und Gal-8 mit einem Maus-anti-Gal-8 Antikörper angereichert. Es kann eine Interaktion zwischen Gal-3 bzw. Gal-8 mit  $\beta$ -Catenin bzw.  $\gamma$ -Catenin dargestellt werden. Mit Hilfe eines Pan-Ras Antikörpers kann eine Interaktion zwischen Gal-8 und Ras gezeigt werden. Ein Ansatz wurde mit einem unspezifischen anti-Maus Antikörper präzipitiert und dient als Negativkontrolle. Es wurden 80 ng rek. Gal-8 und 8 ng rek. Gal-3 verwendet. Als Beladungskontrolle dient der Nachweis von GAPDH. Diese Abbildung stellt repräsentativ die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen dar. Abkürzungen: Gal: Galektin, GAPDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, IP: Immunpräzipitation, kDa: Kilodalton, rek.: rekombinant, unspez. Ba.: unspezifische Bande

Die Zelllinie Calu-3 exprimiert, wie die Zelllinie Panc-1, endogen Galektin-3 und Galektin-8. Die Präzipitation der Galektine erfolgte mit anti-Gal-3 bzw. anti-Gal-8 Antikörper, gekoppelt an ferromagnetische  *$\mu$ MACS Protein G Beads*. Auch hier wird bei Präzipitation mit dem anti-Galektin-3 Antikörper zusätzlich Galektin-8 angereichert, was auf eine mögliche Kreuzreaktivität des anti-Galektin-3 Antikörpers zurückzuführen ist. Bei Präzipitation von Galektin-8 kopräzipitieren  $\beta$ -Catenin und  $\gamma$ -Catenin. Da bei Präzipitation mit anti-Galektin-3 Antikörper auch Galektin-8 präzipitiert wird und die Menge an kopräzipitiertem  $\beta$ -Catenin und  $\gamma$ -Catenin geringer ist als bei alleiniger Präzipitation von Galektin-8, ist es nicht möglich, eine Aussage über eine mögliche Interaktion von Galektin-3 und  $\beta$ -Catenin und  $\gamma$ -Catenin in der Zelllinie Calu-3 zu treffen (Abbildung 4.11). Durch Präzipitation von Galektin-8 und Kopräzipitation von Ras kann eine Interaktion von Galektin-8 mit Ras belegt werden. Bei Präzipitation von Galektin-3 konnte kein Ras im Western-Blot detektiert werden. Zur Lysatherstellung wurde NOP-Lysepuffer verwendet.

#### 4.3.3 Präzipitation von $\beta$ -Catenin

Nachdem Galektin-3 und Galektin-8 in verschiedenen Zelllinien präzipitiert und die Kopräzipitation von Cateninen und K-Ras untersucht wurde, wurde als nächstes der inverse Ansatz gewählt und  $\beta$ -Catenin präzipitiert und analysiert, ob auch in diesem Ansatz Galektin-3 oder -8 kopräzipitiert werden können. Hierfür wurde Zelllysate der Zelllinien HEK-293, H1299 und Panc-1 verwendet.

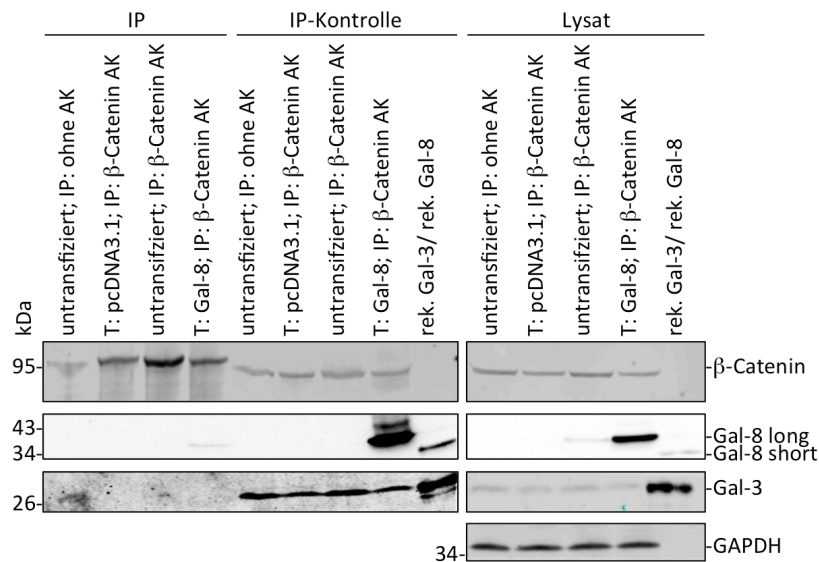


**Abbildung 4.12: Immunpräzipitation von  $\beta$ -Catenin in der Zelllinie HEK-293.** Pro Ansatz wurde je 800  $\mu$ g Lysat eingesetzt. Zur Kontrolle der eingesetzten Mengen wurden 25  $\mu$ l IP-Ansatz und 50  $\mu$ g Lysat aufgetragen. Präzipitiert wurde mit einem Maus-anti- $\beta$ -Catenin Antikörper. Es zeigt sich eine Interaktion von ekto exprimiertem Gal-8 und  $\beta$ -Catenin. Als Negativkontrollen dienen ein Ansatz, der ekto Gal-8 exprimiert und mit anti-Cadherin-11 Antikörper präzipitiert wurde und ein weiterer Ansatz, welcher mit pcDNA3.1 transfiziert und mit Maus-anti- $\beta$ -Catenin Antikörper präzipitiert wurde. Es wurden 80 ng rek. Gal-8 und 8 ng rek. Gal-3 verwendet. Als Beladungskontrolle dient der Nachweis von GAPDH. Diese Abbildung stellt repräsentativ die Ergebnisse von fünf unabhängigen Versuchen dar. Abkürzungen: Gal: Galektin, GAPDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, IP: Immunpräzipitation, kDa: Kilodalton, rek.: rekombinant

In HEK-293-Zellen wurde endogenes  $\beta$ -Catenin mit Hilfe eines Maus-anti- $\beta$ -Catenin Antikörpers, gekoppelt an *Protein G Agarose Beads*, präzipitiert und auf eine Interaktion mit ekto exprimiertem Galektin-3 und Galektin-8 long untersucht. In Abbildung 4.12 kann eine Interaktion von  $\beta$ -Catenin mit Galektin-8 long, jedoch nicht mit Galektin-3 detektiert werden. In der Negativkontrolle zeigt sich eine unspezifische Bande auf Höhe von Galektin-8, was auf eine mögliche unspezifische Bindung von Galektin-8 an den eingesetzten Antikörper zurückzuführen sein könnte. Für die Negativkontrolle wurde ein anti-Cadherin-11 Antikörper eingesetzt. Cadherin-11 ist ein nicht-klassisches Cadherin, welches nicht an Catenine bindet und somit keinen Einfluss auf dieses System ausüben sollte. Auch unter Verwendung eines unspezifischen anti-Kaninchen Kontrollantikörpers kam es zu einer unspezifischen Bande auf Höhe von Galektin-8 in der Negativkontrolle. Ein eventueller Einfluss der *Beads* wurde durch Austausch der *Protein G Agarose Beads* durch *EZview Red Protein A Affinity Gel* untersucht. Zudem wurde anstatt eines Maus-anti- $\beta$ -Catenin Antikörpers ein Kaninchen-anti- $\beta$ -Catenin Antikörper eingesetzt. Trotz der veränderten Versuchsbe-

dingungen kann ebenfalls eine unspezifische Bindung auf Höhe von Galektin-8 nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

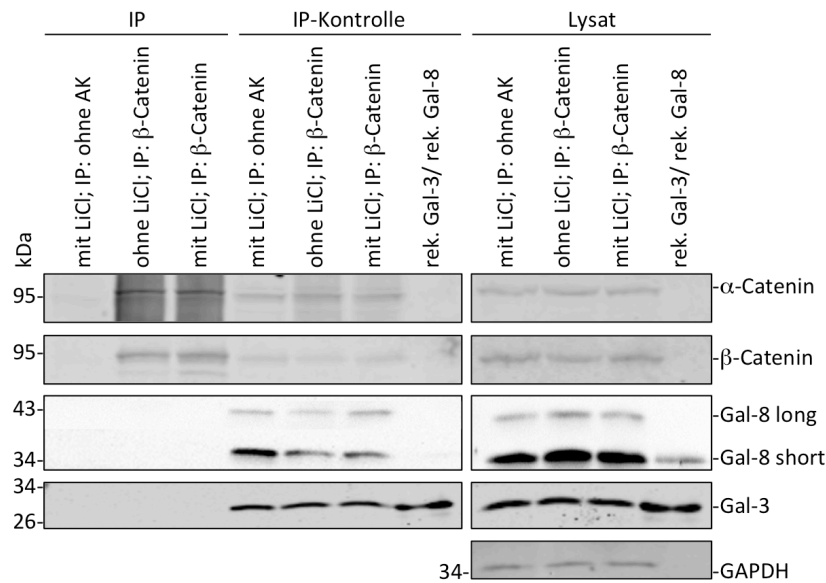
Die Präzipitation von  $\beta$ -Catenin wurde als nächstes mit Lysaten der NSCLC-Zelllinie H1299 durchgeführt.



**Abbildung 4.13: Immunpräzipitation von  $\beta$ -Catenin in der Zelllinie H1299.** Pro IP-Ansatz wurde bei untransfizierten Zellen 2,5 mg und bei transfizierten Zellen 1,5 mg Lysat eingesetzt. Um die in der IP eingesetzten Lysatmengen zu kontrollieren, wurden 25  $\mu$ l IP-Ansatz und 50  $\mu$ g Lysat aufgetragen. Als Negativkontrollen dienen ein IP-Ansatz ohne Antikörper und ein Ansatz, der mit einem Leervektor transfiziert wurde. Zur Präzipitation wurde ein Kaninchen-anti- $\beta$ -Catenin Antikörper verwendet. Es zeigt sich bei Präzipitation von  $\beta$ -Catenin eine Kopräzipitation von ektop exprimiertem Gal-8. Es wurden 80 ng rek. Gal-8 und 8 ng rek. Gal-3 verwendet. Als Beladungskontrolle dient der Nachweis von GAPDH. Diese Abbildung stellt repräsentativ die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen dar. Abkürzungen: AK: Antikörper, Gal: Galektin, GAPDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, IP: Immunpräzipitation, kDa: Kilodalton, rek.: rekombinant, T: transfiziert

In H1299-Zellen wurde das endogene  $\beta$ -Catenin mit Hilfe eines anti- $\beta$ -Catenin Antikörpers, gekoppelt an *EZview Red Protein A Affinity Gel*, präzipitiert und auf eine Kopräzipitation von endogenem Galektin-3 oder ektop exprimiertem Galektin-8 long untersucht (Abbildung 4.13). Es kann eine Kopräzipitation von Galektin-8, aber nicht von Galektin-3 mit  $\beta$ -Catenin belegt werden. Möglicherweise war in H1299-Zellen die Menge an endogenem Galektin-3 allein nicht ausreichend, um eine Kopräzipitation nachweisen zu können.

Anschließend wurde  $\beta$ -Catenin in der Zelllinie Panc-1 präzipitiert, um eine mögliche Interaktion von  $\beta$ -Catenin mit endogenem Galektin-3 bzw. -8 in dieser Zelllinie zu untersuchen (Abbildung 4.14).

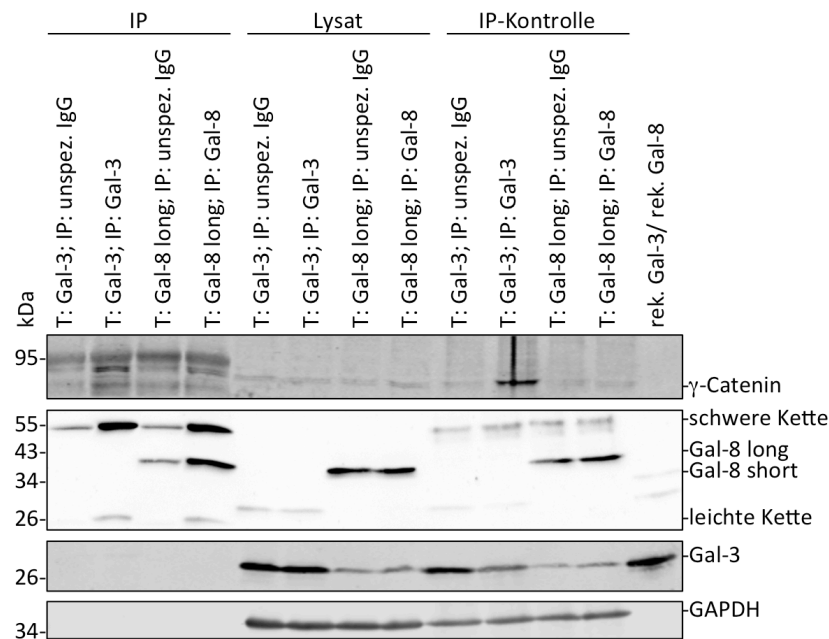


**Abbildung 4.14: Immunpräzipitation von  $\beta$ -Catenin in der Zelllinie Panc-1.** Für die Immunpräzipitation wurde pro Ansatz 1,5 mg Lysat eingesetzt. Als Mengenkontrollen dienen je 25  $\mu$ l IP-Ansatz und 50  $\mu$ g Lysat. Als Negativkontrolle dient ein Ansatz ohne Antikörper. Zur Präzipitation von  $\beta$ -Catenin wurde ein Kaninchen-anti- $\beta$ -Catenin Antikörper benutzt. Der Nachweis einer Kopräzipitation von endogenem Gal-3 oder Gal-8 ist nicht möglich. Es kann auch keine Kopräzipitation nachgewiesen werden, wenn durch 24-stündige Behandlung der Zellen mit 17,5 mM LiCl der intrazelluläre Gehalt an  $\beta$ -Catenin gesteigert wurde. Die Kopräzipitation von  $\alpha$ -Catenin kann gezeigt werden. Es wurden 80 ng rek. Gal-8 und 8 ng rek. Gal-3 eingesetzt. Als Beladungskontrolle dient der Nachweis von GAPDH. Diese Abbildung stellt repräsentativ die Ergebnisse von zwei unabhängigen Versuchen dar. Abkürzungen: AK: Antikörper, Gal: Galektin, GAPDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, IP: Immunpräzipitation, kDa: Kilodalton, LiCl: Lithiumchlorid, rek.: rekombinant

In der Zelllinie Panc-1 wurde  $\beta$ -Catenin mit Hilfe eines anti- $\beta$ -Catenin Antikörpers, gekoppelt an *EZview Red Protein A Affinity Gel*, aufgereinigt und anschließend untersucht, ob endogenes Galektin-3, Galektin-8 oder  $\alpha$ -Catenin kopräzipitiert. Für einen Ansatz wurden die Zellen vor Zelllysatherstellung für 24 h mit 17,5 mM LiCl behandelt, um durch Hemmung der GSK-3 $\beta$  den intrazellulären Gehalt an  $\beta$ -Catenin zu erhöhen. Es konnte keine Interaktion zwischen  $\beta$ -Catenin und einem Galektin dargestellt werden, auch nicht, wenn die Zellen vorher mit LiCl behandelt wurden. Bei Präzipitation von  $\beta$ -Catenin ist die Kolokalisation von  $\alpha$ -Catenin und  $\beta$ -Catenin darstellbar. Dies belegt, dass die Immunpräzipitation technisch funktioniert, da  $\alpha$ - und  $\beta$ -Catenin gemeinsam in den *Adherens Junctions* vorkommen.

#### 4.3.4 Präzipitation von $\gamma$ -Catenin

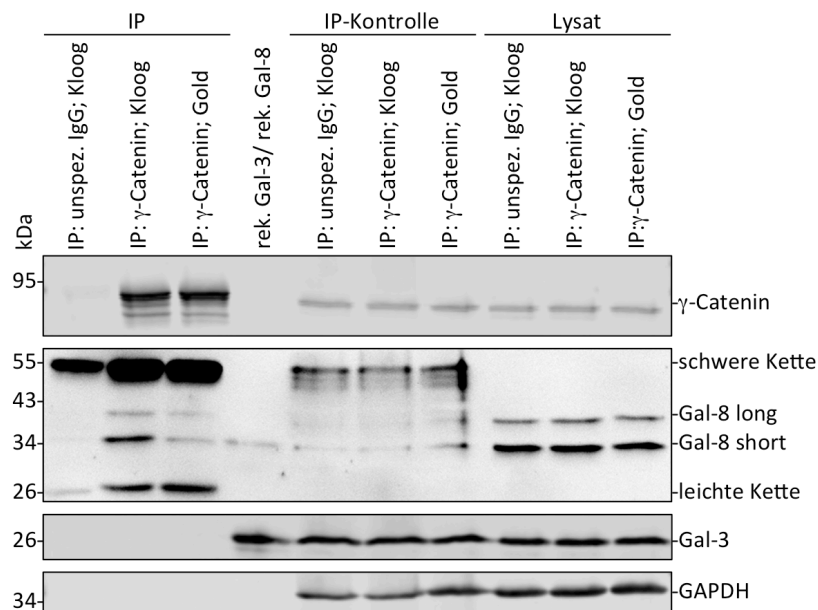
Wie  $\beta$ -Catenin ist auch  $\gamma$ -Catenin Bestandteil des E-Cadherin-Catenin-Komplexes. Es sollte im Folgenden überprüft werden, ob bei Präzipitation von  $\gamma$ -Catenin ebenfalls Galektine kopräzipitieren. Hierzu wurden die Zelllinien H1299 und Panc-1 benutzt.



**Abbildung 4.15: Immunpräzipitation von  $\gamma$ -Catenin in der Zelllinie H1299.** Pro IP-Ansatz wurde 0,5 mg Lysat verwendet. Als Mengenkontrollen wurden 50  $\mu$ g Lysat und 25  $\mu$ l IP-Kontrolle verwendet. Es wurde mit einem Maus-anti- $\gamma$ -Catenin Antikörper präzipitiert. Als Negativkontrollen dienen die Ansätze mit einem unspezifischen anti-Maus Antikörper. Dargestellt ist eine Interaktion von ektop exprimiertem Gal-8 und  $\gamma$ -Catenin. Es wurden 80 ng rek. Gal-8 und 8 ng rek. Gal-3 eingesetzt. Als Beladungskontrolle dient der Nachweis von GAPDH. Diese Abbildung stellt repräsentativ die Ergebnisse von vier unabhängigen Versuchen dar. Abkürzungen: Gal: Galektin, GAPDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, IP: Immunpräzipitation, kDa: Kilodalton, rek.: rekombinant, T: transfiziert

In der Zelllinie H1299 wurde das endogene  $\gamma$ -Catenin mit Hilfe eines anti- $\gamma$ -Catenin Antikörpers, gekoppelt an ferromagnetische  *$\mu$ MACS Protein A Beads*, präzipitiert und auf eine Interaktion mit ektop exprimiertem Galektin-3 und Galektin-8 long untersucht (Abbildung 4.15). Es kann keine Interaktion mit Galektin-3, jedoch eine Interaktion von Galektin-8 und  $\gamma$ -Catenin dargestellt werden. In der Negativkontrolle ist auch eine Bande auf Höhe von Galektin-8 detektierbar. Diese unspezifische Hintergrundbindung ist wesentlich schwächer als die spezifische Interaktion. Die Bande ist möglicherweise auf eine unspezifische Bindung von Galektin-8 an den unspezifischen anti-Maus Antikörper oder die Immobilisierungsmatrix zurückzuführen. Für eine Unspezifität der Bindung von Galektin-8 long an den Kontrollantikörper oder die Immobilisierungsmatrix spricht, dass die unspezifische Bindung nicht in der Negativkontrolle, welche ektop exprimiertes Galektin-3 und kein Galektin-8 enthält, nachzuweisen ist.

Im Anschluss erfolgte die Präzipitation von  $\gamma$ -Catenin der Zelllinie Panc-1 (Abbildung 4.16).



**Abbildung 4.16: Immunpräzipitation von  $\gamma$ -Catenin in der Zelllinie Panc-1.** Pro Ansatz wurde 2,0 mg Lysat verwendet. Zur Kontrolle der verwendeten Mengen wurden je 25  $\mu$ l IP-Ansatz und je 50  $\mu$ g Lysat eingesetzt. Als Negativkontrolle dient ein Ansatz, der mit einem unspezifischen anti-Maus Antikörper präzipitiert wurde. Präzipitiert wurde mit Hilfe eines Maus-anti- $\gamma$ -Catenin Antikörpers. Nachgewiesen werden kann eine Interaktion zwischen endogenem Gal-8 und  $\gamma$ -Catenin. Es wurden 80 ng rek. Gal-8 und 8 ng rek. Gal-3 eingesetzt. Als Beladungskontrolle dient der Nachweis von GAPDH. Diese Abbildung stellt repräsentativ die Ergebnisse von vier unabhängigen Versuchen dar. Abkürzungen: Gal: Galektin, GAPDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, IP: Immunpräzipitation, kDa: Kilodalton, rek.: rekombinant

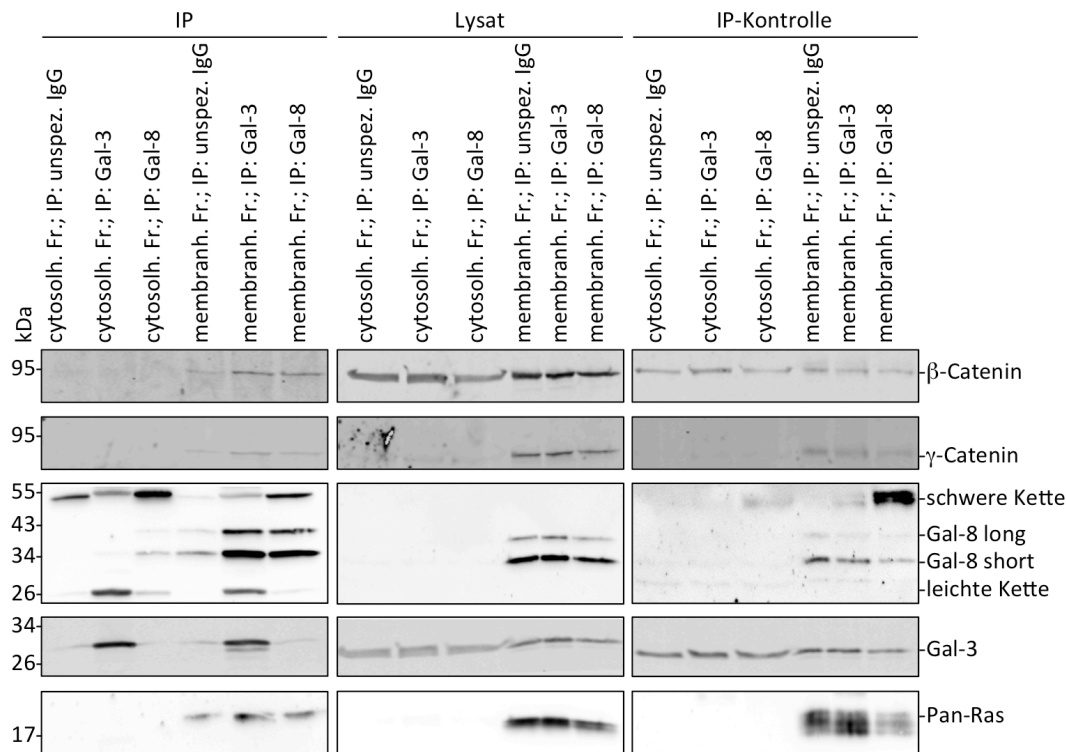
In Panc-1-Zelllysate wurde das endogene  $\gamma$ -Catenin mit Hilfe eines anti- $\gamma$ -Catenin Antikörpers, gekoppelt an  *$\mu$ MACS Protein A Beads*, präzipitiert und auf eine Interaktion mit endogenem Galektin-3 oder Galektin-8 untersucht. Bei Präzipitation von  $\gamma$ -Catenin kann eine Kopräzipitation von endogenem Galektin-8, aber nicht von Galektin-3 im Western-Blot dargestellt werden. Die Interaktion von  $\gamma$ -Catenin und Galektin-8 kann dargestellt werden, egal ob die Zellen in Klooog-Puffer oder Gold-Lyse-Puffer lysiert wurden. Es kopräzipitiert jedoch mehr endogenes Galektin-8 bei Lyse der Zellen in Klooog-Puffer.

#### 4.4 Lokalisationsanalyse der Interaktion von Galektinen und Cateninen nach Zellfraktionierung

Es konnte im Rahmen dieser Arbeit bereits gezeigt werden, dass  $\beta$ -Catenin bzw.  $\gamma$ -Catenin mit Galektin-3 und Galektin-8 interagiert. Zur weiteren Charakterisierung wurden die Zellen mit Hilfe einer Membran-Cytosol-Präparation in eine membran- und eine cytosolhaltige Fraktion aufgetrennt und anschließend mittels Immunpräzipitation Interaktionsstudien durchgeführt, um zu analysieren, ob die Interaktion an der

Zellmembran oder im Cytoplasma stattfindet. Verwendet wurde die Zelllinie Panc-1, da sie sowohl endogenes Galektin-3 als auch endogenes Galektin-8 enthält.

In Panc-1-Zellen wurden Galektin-3 und -8 mit Hilfe spezifischer Antikörper, gekoppelt an *μMACS Protein G Beads*, aus einer membran- und einer cytosolhaltigen Fraktion getrennt voneinander aufgereinigt (Abbildung 4.17).



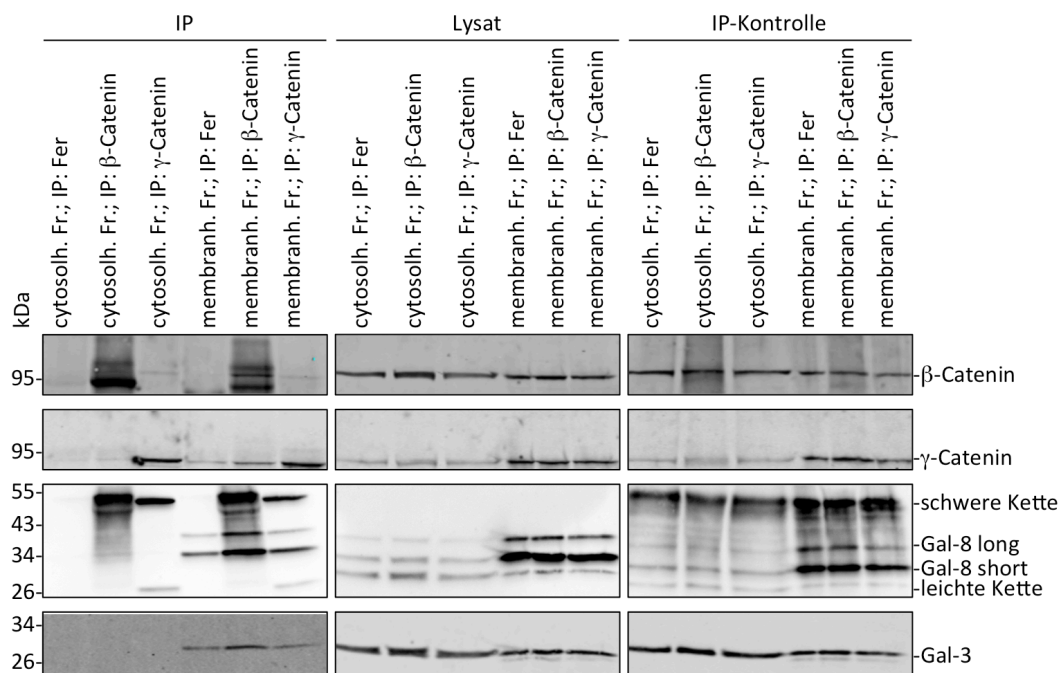
**Abbildung 4.17: Immunpräzipitation von Galektin-3 und Galektin-8 in der Zelllinie Panc-1 nach Membran-Cytosol-Präparation.** Zur Immunpräzipitation wurde pro Ansatz 500  $\mu$ g cytosolhaltige oder 250  $\mu$ g membranhaltige Fraktion eingesetzt. Als Kontrollen der Mengen dienen je 50  $\mu$ g cytosolhaltige bzw. 30  $\mu$ g membranhaltige Fraktion und 25  $\mu$ l IP-Ansatz. Präzipitiert wurde mit einem Maus-anti-Gal-3 Antikörper und einem Maus-anti-Gal-8 Antikörper. Als Negativkontrollen dienen Ansätze, in welchen mit einem unspezifischen anti-Maus Antikörper präzipitiert wurde. In der membranhaltigen Fraktion ist eine Kopräzipitation von Gal-3 bzw. Gal-8 mit  $\beta$ - und  $\gamma$ -Catenin nachweisbar. Ebenfalls ist eine Interaktion zwischen Ras und Gal-3 bzw. Gal-8 detektierbar. Diese Abbildung stellt repräsentativ die Ergebnisse von zwei unabhängigen Versuchen dar. Abkürzungen: cytosolh. Fr.: cytosolhaltige Fraktion, Gal: Galektin, IP: Immunpräzipitation, kDa: Kilodalton, membranh. Fr.: membranhaltige Fraktion

In der membranhaltigen Fraktion ist bei Präzipitation von Galektinen die Kopräzipitation von  $\beta$ -Catenin und  $\gamma$ -Catenin nachweisbar. Bei der Präzipitation von Galektin-3 mit einem anti-Galektin-3 Antikörper kommt es neben der spezifischen Anreicherung von Galektin-3 auch zu einer unspezifischen Anreicherung von Galektin-8, was auf eine eventuelle Kreuzreaktion des Antikörpers schließen lässt. Da bei Präzipitation mit dem anti-Galektin-3 Antikörper eine größere Menge sowohl an  $\beta$ -Catenin als auch an  $\gamma$ -Catenin kopräzipitiert als bei Präzipitation mit dem anti-Galektin-8 Antikörper, ist



davon auszugehen, dass  $\beta$ -Catenin und  $\gamma$ -Catenin mit beiden untersuchten Galektinen interagieren. Ebenfalls kann eine Interaktion von Galektin-3 und Galektin-8 mit Ras gezeigt werden. Die schwachen Proteinbanden in der Negativkontrolle sind auf eine eventuelle unspezifische Bindung von Galektin-3 und Galektin-8 an den unspezifischen anti-Maus Kontrollantikörper oder an die Immobilisierungsmatrix zurückzuführen.

Abschließend sollten in einem umgekehrten Ansatz  $\beta$ - und  $\gamma$ -Catenin in der Zelllinie Panc-1 in einer membran- und einer cytosolhaltigen Fraktion präzipitiert und auf Kopräzipitation von Galektin-3 oder -8 untersucht werden (Abbildung 4.18).



**Abbildung 4.18: Immunpräzipitation von  $\beta$ -Catenin und  $\gamma$ -Catenin in der Zelllinie Panc-1 nach Membran-Cytosol-Präparation.** Zur Immunpräzipitation wurde pro Ansatz 500  $\mu$ g cytosolhaltige oder 250  $\mu$ g membranhaltige Fraktion eingesetzt. Als Kontrollen der Mengen dienen je 50  $\mu$ g cytosolhaltige bzw. 30  $\mu$ g membranhaltige Fraktion und 25  $\mu$ l IP-Ansatz. Die Präzipitation erfolgte mit einem Kaninchen-anti- $\beta$ -Catenin Antikörper und einem Maus-anti- $\gamma$ -Catenin Antikörper. Als Negativkontrollen dienen Ansätze, in welchen mit einem unspezifischen Kaninchen-anti-Fer Antikörper präzipitiert wurde. Es kann bei Präzipitation von  $\beta$ - bzw.  $\gamma$ -Catenin gezeigt werden, dass Gal-3 bzw. Gal-8 kopräzipitieren. Diese Abbildung stellt repräsentativ die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen dar. Abkürzungen: cytosolh. Fr.: cytosolhaltige Fraktion, Gal: Galektin, IP: Immunpräzipitation, kDa: Kilodalton, membran. Fr.: membranhaltige Fraktion

Die Präzipitation von  $\beta$ -Catenin und  $\gamma$ -Catenin erfolgte in der Zelllinie Panc-1 mittels anti- $\beta$ -Catenin und anti- $\gamma$ -Catenin Antikörpers, gekoppelt an  *$\mu$ MACS Protein A Beads*, nach erfolgter Subfraktionierung in eine cytosol- und eine membranhaltige Fraktion. Im Western-Blot lässt sich eine Immunpräzipitation von  $\beta$ - und  $\gamma$ -Catenin in der cytosol- und der membranhaltigen Fraktion nachweisen. Bei Präzipitation von  $\beta$ - und  $\gamma$ -Catenin werden Galektin-3 bzw. Galektin-8 in der membranhaltigen Fraktion jedoch

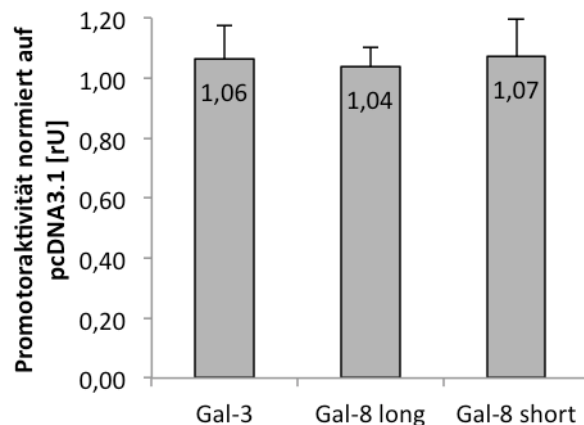
nicht in der cytosolhaltigen Fraktion kopräzipitiert. Die Kopräzipitation von Galektin-3 und Galektin-8 in der membranhaltigen Fraktion weist auf eine Interaktion von Galektin-3 bzw. -8 mit  $\beta$ - und  $\gamma$ -Catenin an der Membran hin.

#### 4.5 Luziferase-Assay

Es konnte anhand der Immunfluoreszenzversuche (Abbildung 4.4 und 4.5) dargestellt werden, dass  $\beta$ -Catenin und Galektin-3 bzw. -8 im Zellkern kolokalisiert vorkommen. Im Folgenden soll untersucht werden, ob durch Galektine die Bildung des Komplexes aus  $\beta$ -Catenin und Transkriptionsfaktoren der Tcf/Lef-Familie beeinflusst wird und somit in die Regulation der Expression von Zielgenen involviert ist. Verwendet wurde der Reportergenvektor pGL3/TOPflash, welcher 3-mal hintereinander eine Tcf-Bindungsstelle besitzt und somit spezifisch für die Aktivität der  $\beta$ -Catenin Interaktionsfaktoren Tcf/Lef bzw. für die Aktivität des Wnt-Signalweges ist.

##### 4.5.1 Wnt-Reporterassays

Als erstes sollte die Promotoraktivität des TOPflash-Reporters in HEK-293-Zellen untersucht werden. Es sollte die Regulierung der Promotoraktivität durch Galektin-3 und Galektin-8 long bzw. short analysiert werden. Es kann keine Veränderung der Promotoraktivität durch die koexprimierten Galektine gemessen werden.

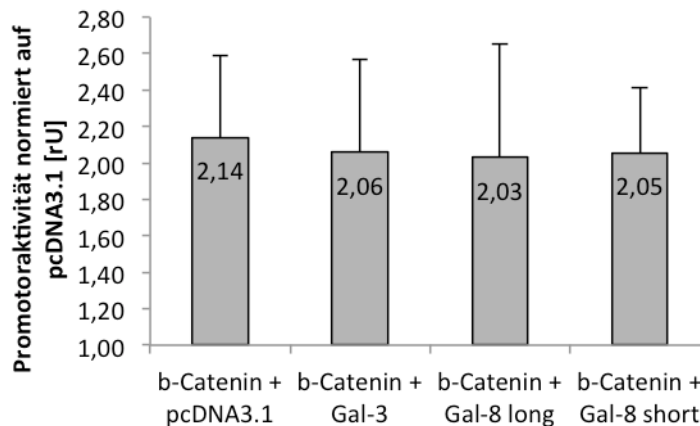


**Abbildung 4.19: Luziferase-Assay zur Bestimmung des Einflusses von Galektin-3 und -8 long bzw. short auf die Aktivität eines Wnt-responsiven Promotors (TOPflash) in HEK-293-Zellen.** Die Zellen wurden mit den Plasmiden pGL3/TOPflash und pRL-TK im Verhältnis 10:1 und mit dem jeweiligen Expressionsvektor transfiziert. Die Expressionsvektoren pcDNA3.1, pcDNA3.1/Galektin-3 und pcDNA3.1/Galektin-8 long bzw. short wurden verwendet. Die relative Luziferaseaktivität wurde in Relation zur Reporteraktivität in Zellen mit pcDNA3.1 abgebildet. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von neun unabhängigen Versuchen. Abkürzungen: Gal: Galektin, rU: *relative Units*

Nachdem die untersuchten Galektine alleine keinen Einfluss auf die Promotoraktivität des TOPflash-Reporters zeigten (Abbildung 4.19), sollte durch Überexpression von

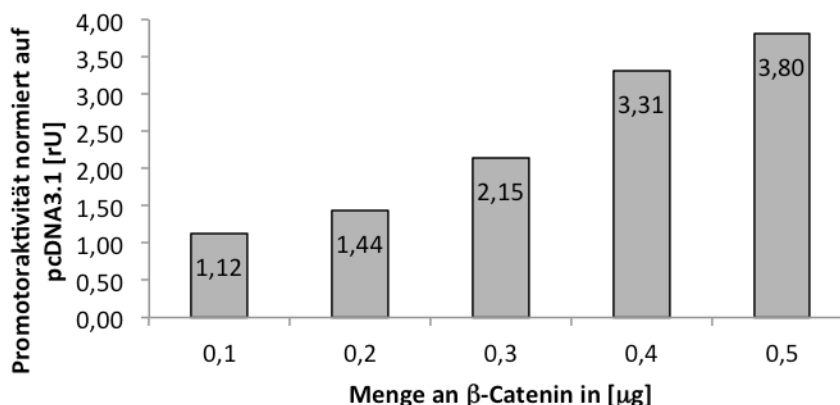
$\beta$ -Catenin der Wnt-Signalweg aktiviert werden und untersucht werden, ob Galektine im aktivierten Wnt-Signalweg eine Bedeutung bei der Regulierung der Promotoraktivität haben.

Auch im aktivierten Wnt-Signalweg wird die Aktivität des Promotors nicht durch Galektin-3 bzw. Galektin-8 long oder short beeinflusst (Abbildung 4.20). Durch die erhöhte  $\beta$ -Catenin Menge kann die Promotoraktivität verdoppelt werden, was zeigt, dass der Wnt-Signalweg erfolgreich aktiviert wurde.



**Abbildung 4.20: Luziferase-Assay zur Bestimmung des Einflusses von Galektin-3 und -8 long bzw. short auf den durch  $\beta$ -Catenin aktivierten Wnt-Signalweg in HEK-293-Zellen.** Die Zellen wurden mit den Reportergenvektoren pGL3/TOPflash und pRL-TK im Verhältnis 10:1 transfiziert. Zusätzlich wurden die Zellen mit den Expressionsvektoren pcDNA3/ $\beta$ -Catenin und pcDNA3.1/Galektin-3, pcDNA3/Galektin-8 long bzw. short oder dem leeren Vektor pcDNA3.1 transfiziert. Die relative Luziferaseaktivität wurde in Relation zur Reporteraktivität in Zellen mit pcDNA3.1 abgebildet. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von acht unabhängigen Versuchen. Abkürzungen: b: beta, Gal: Galektin, rU: *relative Units*

Zur Überprüfung, ob der Wnt-Signalweg durch  $\beta$ -Catenin dosisabhängig aktiviert wird, wurden verschiedene Mengen an  $\beta$ -Catenin verwendet und die Aktivierung des Promotors untersucht (Abbildung 4.21). Es kann eine dosisabhängige Aktivierung der Promotoraktivität durch  $\beta$ -Catenin sichergestellt werden. Diese Darstellung dient als Positivkontrolle und zeigt, dass der Reporter Assay technisch funktioniert.



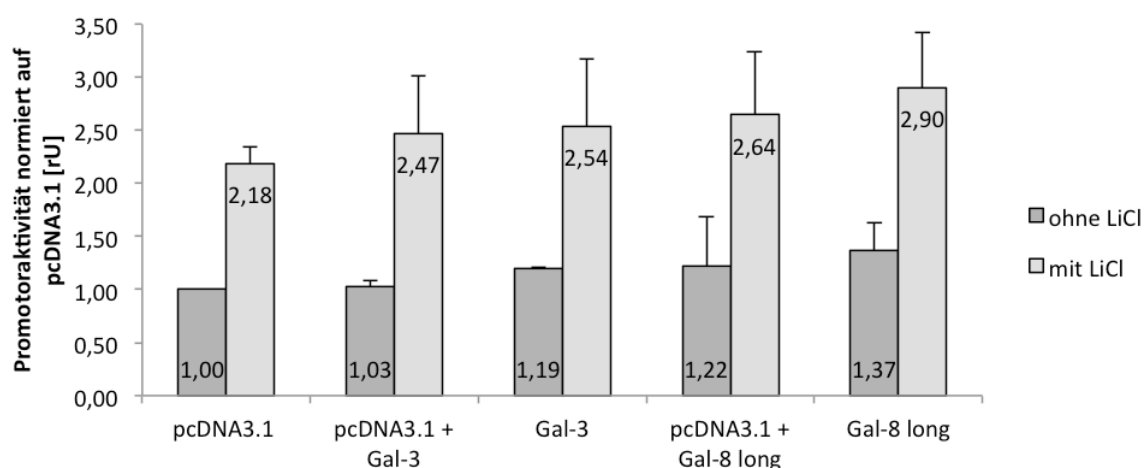
**Abbildung 4.21: Luziferase-Assay zum Nachweis der dosisabhängigen Aktivierung des Wnt-Signalweges durch  $\beta$ -Catenin in HEK-293-Zellen.** Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an  $\beta$ -Catenin sowie mit den Reportervektoren pGL3/TOPflash und pRL-TK im Verhältnis von 10:1 transfiziert. Die DNA-Menge wurde durch zusätzliche Transfektion mit dem leeren Vektor pcDNA3.1 angeglichen, damit in jedem Ansatz dieselbe DNA-Menge transfiziert wurde. Die relative Luziferaseaktivität wurde in Relation zur Reporteraktivität in Zellen mit pcDNA3.1 abgebildet. Dargestellt ist der Mittelwert von zwei unabhängigen Versuchen. Abkürzungen: Gal: Galektin, rU: *relative Units*

Neben der Methode durch Überexpression den cytoplasmatischen Gehalt an  $\beta$ -Catenin zu erhöhen (Abbildung 4.20), bestehen weitere Möglichkeiten die freie Menge an intrazellulärem  $\beta$ -Catenin zu steigern, wie zum Beispiel durch Verlust der Zell-Zell-Kontakte. Dies gelang einerseits durch Kultivierung der Zellen in Suspensionskultur durch spezielle Platten mit glatter Oberfläche, die ein Absetzen der Zellen verhindern, und andererseits durch Calciumentzug der Zellen mit Hilfe von EDTA.

Durch diese beiden Varianten der Steigerung der intrazellulären  $\beta$ -Catenin Menge kann ebenfalls kein Einfluss von Galektin-3 oder Galektin-8 long auf die Promotoraktivität verzeichnet werden (Ergebnisse nicht gezeigt).

Eine weitere Option zur Erhöhung des intrazellulären Gehalts an  $\beta$ -Catenin ist die Behandlung der Zellen mit Lithiumchlorid. Lithiumchlorid ist ein Hemmstoff der GSK-3 $\beta$ -Aktivität und verhindert so die intrazelluläre Degradation von  $\beta$ -Catenin.

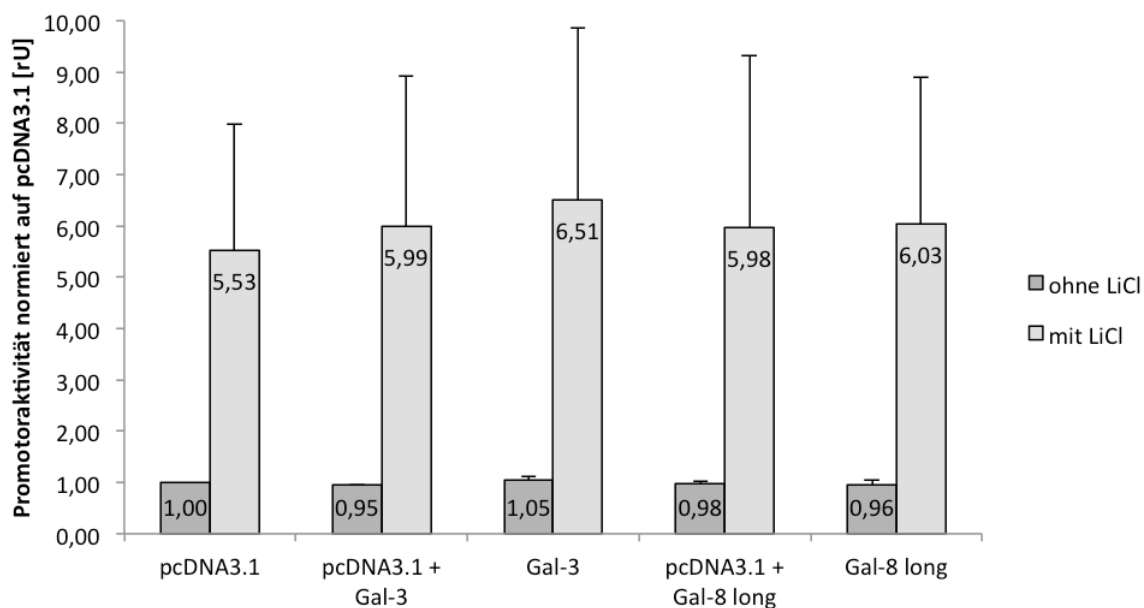
Es kann eine leichte Aktivierung der Promotoraktivität durch Galektin-3 und Galektin-8 long in mit Lithiumchlorid behandelten HEK-293-Zellen ausgemacht werden (Werte nach Zugabe von LiCl, pcDNA3.1: 2,18 $\pm$ 0,16; Gal-3 + pcDNA3.1: 2,47 $\pm$ 0,54; Gal-3: 2,54 $\pm$ 0,63; Gal-8 long + pcDNA3.1: 2,64 $\pm$ 0,60; Gal-8 long: 2,90 $\pm$ 0,52).



**Abbildung 4.22: Luziferase-Assay zur Bestimmung des Einflusses von Galektin-3 und -8 long auf den durch LiCl aktivierten Wnt-Signalweg in HEK-293-Zellen.** Die Transfektion erfolgte mit pGL3/TOPflash und pRL-TK im Verhältnis von 10:1. Bei den Expressionsvektoren wurde bei Transfektion von Galektin und pcDNA3.1 im Verhältnis von 1:1 transfiziert. 6 h nach Transfektion wurden die Zellen mit 10 mM bzw. 17,5 mM LiCl behandelt. Die relative Luziferaseaktivität wurde in Relation zur Reporteraktivität in

Zellen mit pcDNA3.1 abgebildet. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen. Abkürzungen: Gal: Galektin, LiCl: Lithiumchlorid, rU: *relative Units*

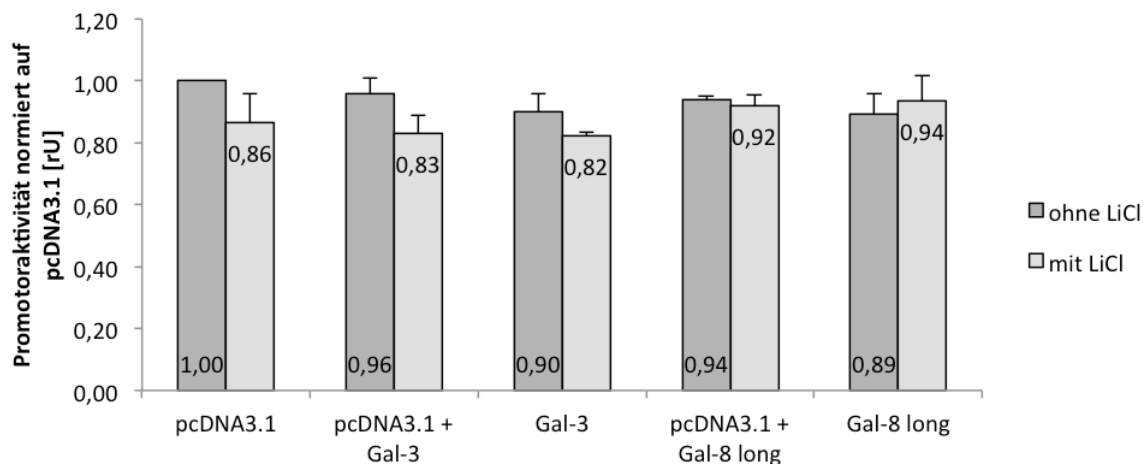
In der Pankreaskarzinomzelllinie (Panc-1) und der Bronchialkarzinomzelllinie (H1299) wurde die Promotoraktivität des Wnt-responsiven Promotors TOPflash ebenfalls analysiert, um die Ergebnisse der Zelllinie HEK-293 in andere zelluläre Systeme zu übertragen. Da die Versuche mit HEK-293-Zellen eine tendenzielle Steigerung der Promotoraktivität, reguliert durch Galektine in mit Lithiumchlorid behandelten Zellen zeigten (Abbildung 4.22), wurden die Zellen zur Erhöhung der intrazellulären  $\beta$ -Catenin Konzentration mit Lithiumchlorid behandelt. In der mit Lithiumchlorid behandelten Zelllinie Panc-1 lässt sich der tendenzielle Anstieg der Promotoraktivität (Abbildung 4.23), reguliert durch Galektin-3 bzw. Galektin-8 long, reproduzieren (Werte nach Zugabe von LiCl, pcDNA3.1: 5,53+/-2,46; pcDNA3.1 + Gal-3: 5,99+/-2,95; Gal-3: 6,51+/-3,35; pcDNA3.1 + Gal-8 long: 5,98+/-3,34; Gal-8 long: 6,03+/-2,87). Die hohen Standardabweichungen lassen sich durch die schlechten Transfektionseffizienzen der Panc-1-Zellen mit DMRIE-C erklären.



**Abbildung 4.23: Luziferase-Assay zur Bestimmung des Einflusses von Galektin-3 und -8 long auf TOPflash, einen Wnt-responsiven Promotor in Panc-1-Zellen.** Die Zellen wurden mit pGL3/TOPflash und pRL-TK im Verhältnis von 10:1 sowie mit den Expressionsvektoren transfiziert. Wurden gleichzeitig pcDNA3.1 und ein Galektin transfiziert, erfolgte die Transfektion im Verhältnis von 1:1. Die Zellen wurden 6 h nach der Transfektion mit 25 mM LiCl für 24 h behandelt. Die relative Luziferaseaktivität wurde in Relation zur Reporteraktivität in Zellen mit pcDNA3.1 abgebildet. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von vier unabhängigen Versuchen. Gal: Galektin, LiCl: Lithiumchlorid, rU: *relative Units*

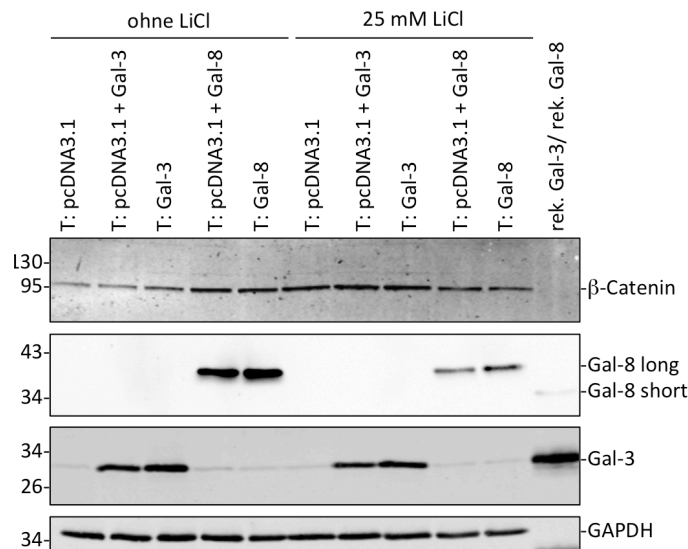
Im Gegensatz zu Panc-1-Zellen kann bei der Verwendung von H1299-Zellen keine erhöhte Promotoraktivität durch die Behandlung der Zellen mit Lithiumchlorid erzielt

werden (Abbildung 4.24). Es kann keine Aktivierung der Promotoraktivität durch Galektin-3 oder Galektin-8 long nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu HEK-293 und Panc-1 kommt es zu einer tendenziellen Verringerung der Promotoraktivität durch Behandlung der Zellen mit Lithiumchlorid (Werte nach Zugabe von LiCl, pcDNA3.1:  $0,86 \pm 0,10$ ; pcDNA3.1 + Gal-3:  $0,83 \pm 0,06$ ; Gal-3:  $0,82 \pm 0,01$ ; pcDNA3.1 + Gal-8 long:  $0,92 \pm 0,03$ ; Gal-8 long:  $0,94 \pm 0,08$ ).



**Abbildung 4.24: Luziferase-Assay zur Bestimmung des Einflusses von Galektin-3 und -8 long auf TOPflash, einen Wnt-responsiven Promotor in H1299-Zellen.** Transfiziert wurde mit den Reportervektoren pGL3/TOPflash und pRL-TK im Verhältnis 10:1 und mit den entsprechenden Expressionsvektoren. Wurde ein Galektin und pcDNA3.1 parallel transfiziert, erfolgte dies im Verhältnis von 1:1. 6 h nach Transfektion wurden die Zellen einer Behandlung mit 15 mM bzw. 25 mM LiCl unterzogen. Die relative Luziferaseaktivität wurde in Relation zur Reporteraktivität in Zellen mit pcDNA3.1 abgebildet. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen von drei unabhängigen Versuchen. Gal: Galektin, LiCl: Lithiumchlorid, rU: *relative Units*

Zur Überprüfung des Lithiumchlorideffektes auf H1299-Zellen wurden 20 µl des Lysates der Luziferase-Assays mittels Western-Blot analysiert (Abbildung 4.25). Es können ektop exprimiertes Galektin-3 und Galektin-8 long mit Hilfe des Western-Blots nachgewiesen werden. Auch kann gezeigt werden, dass bei Transfektion der doppelten DNA-Menge an pcDNA3.1/Galektin-3 bzw. pcDNA3/Galektin-8 long mehr Galektin-3 bzw. Galektin-8 long exprimiert wird. Durch Behandlung der Zellen mit Lithiumchlorid kann die Menge an  $\beta$ -Catenin gesteigert werden. Leichte Ungleichheiten der Menge an  $\beta$ -Catenin lassen sich durch die Lyse der Zellen mit *Passive Lysis Buffer* erklären, da dieser Puffer nicht für den Nachweis von Proteinen im Western-Blot, sondern für die Messung der Luziferaseaktivität optimiert ist.

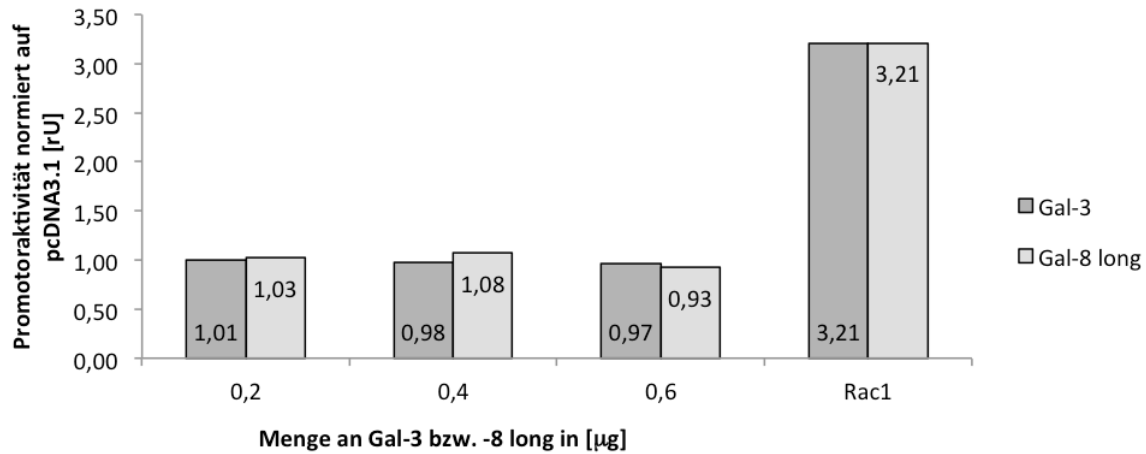


**Abbildung 4.25: Kontrolle der Luziferase-Assay-Proben der Zelllinie H1299.** Aufgetragen wurden 20  $\mu$ l des für die Messung der Luziferaseaktivität bestimmten Lysates. Nachgewiesen werden kann das ektop exprimierte sowie endogene Galektin-3 und das ektop exprimierte Galektin-8 long. Durch Behandlung der Zellen für 24 h mit 25 mM LiCl kann der Gehalt an  $\beta$ -Catenin im Vergleich zu den unbehandelten Zellen gesteigert werden. Es wurden 80 ng rek. Gal-8 und 8 ng rek. Gal-3 eingesetzt. Als Beladungskontrolle dient der Nachweis von GAPDH. Diese Abbildung stellt repräsentativ die Ergebnisse dreier unabhängiger Versuche dar. Abkürzungen: Gal: Galektin, GAPDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, LiCl: Lithiumchlorid, rek.: rekombinant, T: transfiziert

#### 4.5.2 SRE-Reporterassays

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob Galektin-3 oder -8 long einen Einfluss auf die Promotoraktivität des *serum response element* (SRE) Reporterkonstruktes hat. Aktiviert wird das *serum response element* durch *ternary complex factors* (TCFs) und den *serum response factor* (SRF), die unter anderem durch Komponenten des MAPK-Signalweges induziert werden. Rac1 dient als Positivkontrolle des Assays.

Es wurden verschiedene DNA-Mengen der Expressionsvektoren pcDNA3.1/Galektin-3 und pcDNA3/Galektin-8 long verwendet, um eine möglicherweise dosisabhängige Aktivierung des SRE messen zu können. Es kann gezeigt werden, dass Galektin-3 und -8 long keinen Einfluss auf die Aktivität des *serum response element* (SRE) haben (Abbildung 4.26). Durch Rac1 kann die Promotoraktivität um das 3-fache erhöht werden. Die Erhöhung weist nach, dass der Assay technisch funktioniert.



**Abbildung 4.26: Luziferase-Assay zur Bestimmung des Einflusses von Galektin-3 und -8 long auf die SRE-Promotoraktivität in HEK-293-Zellen.** Zur Transfektion wurden pSRE-Luziferase und pRL-TK in einem Verhältnis von 10:1 transfiziert. Als Expressionsfaktoren wurden pcDNA3.1/Galektin-3 und pcDNA3/Galektin-8 long verwendet. Falls nötig, wurde mit dem leeren Expressionsvektor pcDNA3.1 auf eine Menge an DNA von 0,6 µg aufgefüllt. Rac1 dient als Positivkontrolle. Die relative Luziferaseaktivität wurde in Relation zur Reporteraktivität in Zellen mit pcDNA3.1 abgebildet. Dargestellt ist der Mittelwert von zwei unabhängigen Versuchen. Gal: Galektin, rU: *relative Units*, SRE: *serum response element*



## 5. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion von Galektin-8 mit Cateninen und der Einfluss auf den Wnt-Signalweg in Lungen- und Pankreaskarzinomzelllinien analysiert. Erstmals konnte eine Bindung zwischen Galektin-8 und  $\beta$ -Catenin mittels Koimmunpräzipitationsstudien experimentell belegt werden. Eine Bindung zwischen Galektin-3 und  $\beta$ -Catenin war bereits in der Literatur beschrieben und konnte auch in dieser Arbeit nachvollzogen werden. Zusätzlich konnte  $\gamma$ -Catenin als neuer Bindungspartner sowohl von Galektin-3 als auch von Galektin-8 identifiziert werden. Die Interaktion zwischen Galektin-3 und -8 hat in den verwendeten Zelllinien keine Auswirkungen auf die Aktivität des untersuchten Wnt-Signalweges.

### 5.1 Expression von Cateninen und Galektinen in verschiedenen Lungen- und Pankreaskarzinomzelllinien

Es wurden zur Durchführung dieser Arbeit verschiedene Lungen- und Pankreaskarzinomzelllinien auf ihren Gehalt an Cateninen und Galektinen untersucht. Es konnte gezeigt werden (Abbildung 4.1), dass in den untersuchten Bronchialkarzinomzelllinien H1299, Calu-3 und HCC-44 der  $\gamma$ -Catenin Gehalt mit dem Gehalt an Galektin-3 und Galektin-8 korreliert. Für  $\beta$ -Catenin und Galektin-3 konnte, für die hier untersuchten Bronchialkarzinomzelllinien, die in der Literatur für andere Zelllinien beschriebene Korrelation der Proteinmengen nicht nachgewiesen werden. Von Song et al. (2009) wurde publiziert, dass in den von ihnen analysierten Kolonkarzinomzelllinien LiM6, HT29, HCT116, RKO, SW480 und Caco2 die Menge an endogenem  $\beta$ -Catenin mit der Menge an Galektin-3 korreliert. In den Pankreaskarzinomzelllinien Panc-1, AsPC-1 und BxPC-3 korreliert ebenfalls die Proteinexpression von  $\beta$ -Catenin mit der von Galektin-3 (Kobayashi et al., 2011).

Für die Menge an Galektin-8 ist in der vorliegenden Arbeit keine Korrelation mit der  $\beta$ -Catenin Menge in den verwendeten Bronchialkarzinomzelllinien nachzuweisen. Es zeigt sich eine Korrelation der Proteinexpression von E-Cadherin und Galektin-3 sowie Galektin-8 in den untersuchten Bronchialkarzinomzelllinien H1299, Calu-3 und HCC-44. Diese Ergebnisse stimmen somit nur teilweise mit den Daten von Oyanadel et al. (2018) überein, die ihre Daten dahingehend interpretieren, dass ein erhöhter

Galektin-8 Gehalt mit erniedrigter Proteinmenge an E-Cadherin und erhöhter Proteinmenge an  $\beta$ -Catenin Menge korreliert.

Die Pankreaskarzinomzelllinie Panc-1 exprimiert im Vergleich zu den untersuchten Bronchialkarzinomzelllinien neben Calu-3 die größte Menge an Galektin-3 und insgesamt die größte Menge an Galektin-8 bei mittlerer Expressionsstärke von  $\beta$ - und  $\gamma$ -Catenin.

Es konnte ein gemeinsames Vorhandensein von  $\beta$ - und  $\gamma$ -Catenin sowie von Galektin-3 und -8 in den Zelllinien Calu-3, HCC-44 und Panc-1 gezeigt werden, während für die embryonale Nierenzelllinie HEK-293 und die Bronchialkarzinomzelllinie H1299 endogen neben  $\beta$ - und  $\gamma$ -Catenin nur Galektin-3 nachgewiesen werden konnte. Das Vorhandensein der im Fokus dieser Arbeit stehenden Galektine und Catenine in der Zelle stellt die Voraussetzung für eine mögliche Protein-Protein-Interaktion sowie eine mögliche Einflussnahme auf den Wnt-Signalweg dar.

## **5.2 Lokalisation von Cateninen und Galektinen in der Zelle**

In der vorgelegten Arbeit wurde die subzelluläre Verteilung von  $\beta$ - und  $\gamma$ -Catenin sowie von Galektin-3 und -8 in der Bronchialkarzinomzelllinie Calu-3 und der Pankreaskarzinomzelllinie Panc-1 analysiert. Beide Zelllinien wiesen große Mengen an endogenem Galektin-3 und -8 auf (Abbildung 4.1).

Durch die Immunfluoreszenzfärbungen lässt sich eine Koloalisation der untersuchten Galektine und Catenine im Zellkern der Zelllinien Calu-3 und Panc-1 experimentell belegen (Abbildung 4.4 und 4.5). Eine Ausnahme stellt  $\gamma$ -Catenin dar, welches sich nicht im Nukleus von Calu-3-Zellen anfärben lässt. Das Vorhandensein von Galektinen an der Zellmembran lässt sich ebenfalls mit Immunfluoreszenzversuchen zeigen.

Durch Zellfraktionierungsexperimente, in welchen die cytosol- und die membranhaltige Fraktion von Panc-1-Zellen getrennt voneinander im Western-Blot aufgetragen wurden, kann die Membranlokalisation von Galektin-3 und -8 bestätigt werden (Abbildung 4.3). Auch die in der Immunfluoreszenz gezeigte Koloalisation von  $\beta$ - und  $\gamma$ -Catenin an der Membran kann mit Hilfe der subzellulären Fraktionierung bestätigt werden. Die durchgeführten Fraktionierungsexperimente haben erwiesen, dass verhältnismäßig mehr  $\gamma$ -Catenin als  $\beta$ -Catenin in der membran- als in der cytosolhaltigen

gen Fraktion vorhanden ist. Auch Galektin-8 ist im Vergleich zu Galektin-3 stärker in der membran- als in der cytosolhaltigen Fraktion zu finden.

Durch die Kolo-kalisation von  $\beta$ - und  $\gamma$ -Catenin sowie Galektin-3 und -8 an der Zellmembran ist die Grundlage für eine Interaktion dieser Proteine gegeben.

Andere Arbeitsgruppen haben sich bereits mit der subzellulären Verteilung von  $\beta$ -Catenin und Galektin-3 beschäftigt. Daten über die genaue subzelluläre Verteilung von Galektin-8 existieren kaum. Shimura et al. (2004) haben durch Immunfluoreszenzversuche in der Brustkrebszelllinie BT549 nachgewiesen, dass in dieser Zelllinie die  $\beta$ -Catenin Lokalisation abhängig vom Galektin-3 Gehalt der Zellen ist. Wenn die Zellen kein Galektin-3 exprimieren, befindet sich  $\beta$ -Catenin im Cytoplasma und an der Membran. Wenn die Zellen jedoch Galektin-3 exprimieren, sind Galektin-3 und  $\beta$ -Catenin im Nukleus kolo-kalisiert. Song et al. (2009) konnten die von Shimura et al. (2004) gezeigte Lokalisation von  $\beta$ -Catenin und Galektin-3 in Kolonkarzinomzellen der Zelllinie LiM6 mittels Western-Blot und Immunfluoreszenz bestätigen. Kobayashi et al. (2011) untersuchten die Lokalisation von Galektin-3 und  $\beta$ -Catenin mittels Immunfluoreszenz in Panc-1-Zellen. Wurden die Zellen mit Kontroll-siRNA transfiziert, fand sich  $\beta$ -Catenin im Nukleus und im Cytoplasma. Bei Transfektion der Zellen mit Galektin-3-siRNA war  $\beta$ -Catenin im Cytoplasma und an der Membran. In der vorliegenden Arbeit wurde, im Vergleich zu den existierenden Daten, nur endogenes Galektin-3 und -8 angefärbt, um zu zeigen, dass die Bedingungen für eine mögliche Interaktion mit Cateninen erfüllt sind. Die Darstellung der Galektine an der Zellmembran ist in der vorliegenden Arbeit sehr schwach, was an möglichen Fixierungsunterschieden oder unterschiedlichen Antikörpern, im Vergleich zu Kobayashi et al. (2011), liegen kann.

### **5.3 Interaktion von $\beta$ -Catenin mit Galektinen**

Untersuchungen, die sich mit der Interaktion von  $\beta$ -Catenin und Galektin-8 beschäftigen, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals durchgeführt. Es konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass  $\beta$ -Catenin mit Galektin-8 interagiert. Eine in der Literatur beschriebene Interaktion von  $\beta$ -Catenin und Galektin-3 konnte nachvollzogen werden.

Die Immunpräzipitationsstudien wurden in verschiedenen Modellsystemen durchgeführt. Es kamen mit HEK-293- und H1299-Zellen zum Einsatz, welche nur

endogenes Galektin-3, jedoch kein endogenes Galektin-8 exprimieren (Abbildung 4.1). HEK-293-Zellen zeichnen sich durch eine besonders hohe Transfektionseffizienz aus, wodurch HEK-293 eine Standardzelllinie ist, um große Proteinmengen zu exprimieren. Die Ergebnisse wurden auch in Zelllinien übertragen, welche endogen Galektine exprimieren, aber in der Regel nur geringe Galektin-Proteinmengen enthalten. Es wurden die Zelllinien Panc-1 (Pankreaskarzinomzelllinie) und Calu-3 (Bronchialkarzinomzelllinie) verwendet, die sowohl endogenes Galektin-3 als auch endogenes Galektin-8 besitzen (Abbildung 4.1).

Galektine konnten in Panc-1- und H1299-Zellen nach ektopter Expression mit Hilfe eines GFP/CFP-Tags präzipitiert und kopräzipitierte Catenine im Western-Blot nachgewiesen werden. Um auszuschließen, dass der GFP-Tag Einfluss auf die Interaktion hat, wurde in dem folgenden Ansatz ein Galektin-Expressionskonstrukt verwendet, das keinen GFP-Tag aufwies bzw. mit endogenem Galektin gearbeitet. Hierbei wurden die Galektine mit Galektin-spezifischen Antikörpern präzipitiert. Auch in diesem experimentellen Aufbau konnte  $\beta$ -Catenin kopräzipitiert werden. Um die Stabilität und Bindungsstärke der Interaktion zwischen Galektinen und Cateninen zu überprüfen, wurde der Versuchsansatz umgekehrt und Catenine wurden präzipitiert und kopräzipitierte Galektine detektiert.

Bei den durchgeführten Interaktionsstudien kam es bei Präzipitation von endogenem Galektin-8 in den Zelllinien Panc-1 und Calu-3 zu einer Kopräzipitation von  $\beta$ -Catenin. Nach ektopter Expression und Präzipitation von Galektin-8 in H1299-Zellen konnte ebenfalls  $\beta$ -Catenin nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte in HEK-293-Zellen keine Kopräzipitation von  $\beta$ -Catenin mit Galektin-8 gezeigt werden. Galektine wurden in den Zelllinien Panc-1 und H1299 mit Hilfe ihres GFP/CFP-Tags präzipitiert und  $\beta$ -Catenin kopräzipitierte. Im umgekehrten Ansatz konnte bei Präzipitation von  $\beta$ -Catenin in HEK-293- und H1299-Zellen eine Kopräzipitation von ektopt exprimiertem Galektin-8 nachgewiesen werden. Allerdings konnte kein endogenes Galektin-8 in Panc-1-Zellen kopräzipitiert werden.

In dieser Arbeit wurde die bereits in der Literatur beschriebene Interaktion von  $\beta$ -Catenin und Galektin-3 bestätigt. Bei der Präzipitation von endogenem Galektin-3 in den Zelllinien Panc-1 und H1299 wurde eine Kopräzipitation von  $\beta$ -Catenin

nachgewiesen. Jedoch konnte diese Kopräzipitation von  $\beta$ -Catenin nicht bei der Präzipitation von ektop exprimiertem Galektin-3 in der Zelllinie HEK-293 gezeigt werden. Ektop exprimiertes Galektin-3 konnte in Panc-1- und H1299-Zellen mit Hilfe eines GFP/CFP-*Tags* angereichert und die Kopräzipitation von  $\beta$ -Catenin im Western-Blot nachgewiesen werden. Bei Präzipitation von  $\beta$ -Catenin konnte keine Kopräzipitation von ektop exprimiertem Galektin-3 in den Zelllinien HEK-293 und H1299 und ebenfalls konnte keine Kopräzipitation von endogenem Galektin-3 in Panc-1-Zellen gezeigt werden.

In den Zelllinien Panc-1 und H1299 macht es weder für Galektin-8 noch für Galektin-3 einen Unterschied, ob die Galektine mit oder ohne Hilfe des GFP/CFP-*Tags* aufgereinigt wurden. In jedem Fall kam es zu einer Kopräzipitation von  $\beta$ -Catenin.

Zur Präzipitation der Galektine wurden in den Zelllinien Panc-1, H1299 und Calu-3 die Antikörper an ferromagnetische *Beads* (Miltenyi) und in der Zelllinie HEK-293 an *EZview Red Affinity Gel* gekoppelt. Zur Präzipitation von  $\beta$ -Catenin wurde in allen Zelllinien *EZview Red Affinity Gel* und in HEK-293-Zellen auch *Agarose Beads* verwendet. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass es einen Unterschied macht, welche Immobilisierungsmatrix verwendet wurde. Ferromagnetischen *Beads* (Miltenyi) eignen sich am besten, um eine Interaktion zwischen Cateninen und Galektinen darzustellen. Eine Kopräzipitation von Galektin-3 oder -8 bzw.  $\beta$ -Catenin gelingt zuverlässig unter Verwendung von ferromagnetischen *Beads* (Miltenyi), da mit dieser Methode die möglicherweise schwache Bindung zwischen dem untersuchten Galektin und  $\beta$ -Catenin optimal stabilisiert und damit nachgewiesen werden kann. Es ist davon auszugehen, dass unter Verwendung des *EZview Red Affinity Gel* die Pufferbedingungen oder Waschschrte nicht optimal waren, um eine Interaktion zwischen Galektin-3 oder -8 und  $\beta$ -Catenin zu erhalten. Durch Zentrifugation und Waschschrte, wie sie unter Verwendung des *EZview Red Affinity Gel* bzw. der *Agarose Beads* zum Einsatz kommen, könnten fragile Bindungen zwischen Galektinen und  $\beta$ -Catenin zerstört werden. Zudem kann es beim Einsatz von *EZview Red Affinity Gel* durch Ungenauigkeiten beim Arbeiten, wie beispielsweise beim Absaugen der *Beads* und bei der Resuspension, zu einem Verlust von *Beads* kommen und die ohnehin schon schwache Bande kann dadurch nicht mehr detektierbar werden.

Zur Überprüfung der Spezifität der Interaktion von Galektin-3 oder -8 mit  $\beta$ -Catenin wurde immer eine unspezifische Negativkontrolle ohne Antikörper oder mit unspezifischem Kontrollantikörper durchgeführt. Hierbei ließ sich teilweise, wie beispielsweise in Abbildung 4.12 zu sehen, eine Bande auf Höhe von Galektin-8 in der Negativkontrolle nachweisen. Da die Bande in der Negativkontrolle schwächer war als in der Immunpräzipitation mit spezifischem Antikörper, ist davon auszugehen, dass es sich um eine schwache, unspezifische Bindung handelt. Diese resultiert vermutlich aus einer unspezifischen Bindung von Galektin-8 entweder an den Kontrollantikörper oder an die *Beads*.

Ein weiteres Problem bei der Präzipitation stellte die Kreuzreaktivität des anti-Galektin-3 Antikörpers dar. Es kam neben der Präzipitation von Galektin-3 auch zur Präzipitation von Galektin-8. Die Problematik der Kreuzreaktivität des anti-Galektin-3 Antikörpers mit Galektin-8 ist auch im Datenblatt des Antikörpers vermerkt. Die Kreuzreaktivität des Antikörpers lässt sich unabhängig davon nachweisen, ob mit einem Ziege-anti-Galektin-3 oder mit einem Maus-anti-Galektin-3 Antikörper gearbeitet wurde. Dieses Phänomen ließ sich jedoch nur in Zelllinien wie Panc-1 und Calu-3, die endogen Galektin-3 und -8 exprimieren, und nicht in Zelllinien mit ekto exprimierten Galektinen nachweisen. Wie in Abbildung 4.10 dargestellt, wurde in einem Ansatz Galektin-3 und aufgrund der Kreuzreaktivität des anti-Galektin-3 Antikörpers auch Galektin-8 präzipitiert. In einem weiteren Ansatz ist die Präzipitation von Galektin-8 mit Hilfe eines anti-Galektin-8 Antikörpers zu sehen. Da die Menge an kopräzipitiertem  $\beta$ -Catenin bei Präzipitation von Galektin-3 und -8 größer ist als bei alleiniger Präzipitation von Galektin-8, ist von einer spezifischen Interaktion von Galektin-3 mit  $\beta$ -Catenin trotz Kreuzreaktivität des Antikörpers auszugehen. Im Vergleich dazu ist eine mögliche Interaktion zwischen Galektin-3 und  $\beta$ -Catenin in Calu-3-Zellen nicht beurteilbar, da bei Präzipitation mit einem anti-Galektin-3 Antikörper auch Galektin-8 aufgereinigt wird und die Menge an kopräzipitiertem  $\beta$ -Catenin geringer ist als bei ausschließlicher Präzipitation von Galektin-8 (Abbildung 4.11).

Galektin-3 spielt eine Rolle im Wnt-Signalweg in Brustkrebskarzinomzellen, indem es mit  $\beta$ -Catenin interagieren kann (Shimura et al., 2005; Shimura et al., 2004). Zur

Analyse, ob Galektin-3 mit  $\beta$ -Catenin im Komplex vorliegt, haben Shimura et al. (2004) Immunpräzipitationsstudien mit der Brustkrebszelllinie BT549 durchgeführt. Das Zelllysate wurde entweder mit anti-Galektin-3 Antikörper oder anti- $\beta$ -Catenin Antikörper inkubiert und im Western-Blot mit dem entgegengesetzten Antikörper analysiert. Im Western-Blot konnten die Autoren kopräzipitiertes Galektin-3 bzw.  $\beta$ -Catenin nachweisen. Bei diesen Versuchen fehlt ein Kontrollansatz, bei welchem mit unspezifischem Antikörper präzipitiert wurde. Auch eine Färbung der eingesetzten Lysatmengen mit GAPDH oder  $\beta$ -Aktin als Beladungskontrolle wurde nicht durchgeführt. Folglich fehlen die Kontrollen bezüglich der Gleichheit der eingesetzten Proteinmengen in der Arbeit von Shimura et al. (2004). Es ist nicht auszuschließen, dass eventuell unterschiedliche Lysatmengen eingesetzt wurden bzw. die Bindungen unspezifisch sind. Song et al. (2009) konnten durch Immunpräzipitation keine direkte Interaktion von  $\beta$ -Catenin und Galektin-3 in Kolonkarzinomzellen nachweisen. Kobayashi et al. (2011) konnten in verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien durch Immunpräzipitation ebenfalls keine klaren Aussagen erzielen, ob es zu einer direkten Interaktion von Galektin-3 und  $\beta$ -Catenin kommt. Chung et al. (2015) gelang es durch Immunpräzipitationsstudien in der Bronchialkarzinomzelllinie H1299 eine direkte Interaktion von Galektin-3 und  $\beta$ -Catenin nachzuweisen. Diese nachgewiesene Interaktion konnte durch einen *knockdown* von Galektin-3 geschwächt werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen keine klare Aussage darüber treffen, ob es sich bei der Interaktion um eine direkte oder indirekte Interaktion zwischen den untersuchten Galektinen und  $\beta$ -Catenin handelt. Es ist nicht auszuschließen, dass ein noch nicht identifiziertes Protein die Interaktion vermittelt.

Die in dieser Arbeit erzielten Daten zeigen in den untersuchten Zelllinien eine Interaktion zwischen  $\beta$ -Catenin und Galektin-8 und bestätigen die bereits existierenden Daten bezüglich Galektin-3 und  $\beta$ -Catenin. Zukünftig bleibt herauszufinden, ob die Interaktion bei aktiviertem oder inaktiviertem Wnt-Signalweg stattfindet. Hierzu könnte der Nachweis des Phosphorylierungszustandes von  $\beta$ -Catenin herangezogen werden.

#### 5.4 Interaktion von $\gamma$ -Catenin mit Galektinen

$\beta$ - und  $\gamma$ -Catenin kommen in den *Zonula Adherens* eine vergleichbare Funktion zu und  $\gamma$ -Catenin ist, wie  $\beta$ -Catenin, an der Modulation des Wnt-Signalweges beteiligt (Giles et al., 2003; Niessen et al., 2011; Swope et al., 2013). Aus diesen Gründen wurden im Rahmen dieser Arbeit Interaktionsstudien durchgeführt, um zu untersuchen, ob neben  $\beta$ -Catenin auch  $\gamma$ -Catenin mit Galektinen interagiert.

Erstmalig konnte in der vorliegenden Arbeit eine Interaktion zwischen einem Galektin und  $\gamma$ -Catenin gezeigt werden. Vergleichsdaten sind in der Literatur nicht beschrieben. Bei Präzipitation von endogenem Galektin-3 bzw. Galektin-8 in Lysaten der Zelllinien Panc-1 und Calu-3 sowie bei Präzipitation von endogenem Galektin-3 und ektoexprimiertem Galektin-8 in der Zelllinie H1299 konnte  $\gamma$ -Catenin kopräzipitiert werden. Bei Präzipitation von  $\gamma$ -Catenin wurde in Panc-1-Zellen endogenes und in H1299-Zellen ektoexprimiertes Galektin-8, jedoch kein endogenes Galektin-3 kopräzipitiert.

Der fehlende Nachweis von gebundenem Galektin-3 bei Präzipitation von  $\gamma$ -Catenin ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass Galektin-3 und -8 um die Bindung an  $\gamma$ -Catenin konkurrieren und Galektin-8 mit einer höheren Affinität an  $\gamma$ -Catenin bindet als Galektin-3.

#### 5.5 Lokalisation der Interaktion von Cateninen und Galektinen

Galektin-1 interagiert membranständig mit H-Ras-GTP und K-Ras-GTP und Galektin-3 interagiert mit K-Ras-GTP an der Membran (Elad-Sfadia et al., 2004; Paz et al., 2001). Die Arbeitsgruppe von Frau Professorin Giehl konnte Galektin-8 ebenfalls als Interaktionspartner von K-Ras identifizieren.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten mit  $\gamma$ -Catenin ein weiterer Interaktionspartner von Galektin-8 und auch Galektin-3 bestimmt werden. Des Weiteren konnte eine in der Literatur beschriebene Interaktion von Galektin-3 mit  $\beta$ -Catenin bestätigt und zudem gezeigt werden, dass auch Galektin-8 eine Interaktion mit  $\beta$ -Catenin eingeht. Von großem Interesse war die Frage, ob Galektine mit membran- oder cytosolhaltigen Cateninen interagieren. Mit Hilfe von Immunpräzipitationsstudien, bei welchen getrennt voneinander mit einer membran- und einer cytosolhaltigen Fraktion gearbeitet wurde, konnte herausgefunden werden, dass Komplexe aus Galektin-3 und



-8 mit sowohl  $\beta$ - als auch  $\gamma$ -Catenin im Wesentlichen aus der zellmembranhaltigen Fraktion isoliert werden konnten (Abbildung 4.17 und 4.18).

Zukünftig muss geklärt werden, ob die Ras-Proteine mit den Cateninen um die Bindung an Galektin-3 und -8 konkurrieren und wie dies eventuell die Regulation verschiedener Ras-abhängiger Signalwege und des Wnt-Signalweges beeinflusst. Darüber hinaus stellt sich die Frage, welche Mikrodomäne der Galektine mit welchem Aminosäurebereich der Catenine interagiert. Wenn Galektine durch verschiedene Bindungsstellen mit Ras-Proteinen und Cateninen interagieren, sollte mittels weiterer Interaktionsstudien geprüft werden, ob ein ternärer Komplex, bestehend aus einem Galektin, einem Catenin und einem Ras-Protein, existiert.

### 5.6 Einfluss der Interaktion von Cateninen und Galektinen auf die Genregulation

Aufgrund des gemeinsamen Vorkommens von Galektinen und Cateninen im Zellkern wurde mit Hilfe von Genreporterassays der mögliche Einfluss von Galektin-3 und -8 auf die  $\beta$ -Catenin-abhängige Genregulation untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurden Genreporterassays in der Zelllinie HEK-293 und anschließend in der Pankreaskarzinomzelllinie Panc-1 und der Bronchialkarzinomzelllinie H1299 durchgeführt. Im Gegensatz zu den Literaturangaben konnte in unbehandelten HEK-293-, Panc-1- und H1299-Zellen keine Erhöhung der  $\beta$ -Catenin-abhängigen Tcf/Lef-induzierten Promotoraktivität durch Galektin-3 oder -8 gemessen werden. Möglicherweise war die Menge an  $\beta$ -Catenin nicht ausreichend, um die Transkriptionsaktivität  $\beta$ -Catenin-abhängiger Zielgene zu beeinflussen. In der Literatur wurde beschrieben, dass eine Kultivierung der Zellen in Suspensionskultur die  $\beta$ -Catenin-abhängige Tcf/Lef-induzierte Promotoraktivität erhöht. Durch die Suspensionskultur kommt es zur Auflösung der Zell-Zell-Kontakte und  $\beta$ -Catenin, welches am Aufbau der *Adherens Junctions* beteiligt ist, wird intrazellulär frei. Im Rahmen dieser Arbeit konnte in HEK-293-Zellen durch Anzucht in Suspensionskultur keine Galektin-abhängige Veränderung in der  $\beta$ -Catenin-abhängigen Tcf/Lef-induzierten Promotoraktivität gemessen werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Ein weiterer Mechanismus zur Steigerung der cytoplasmatischen  $\beta$ -Catenin Konzentration war die Behandlung der Zellen mit Lithiumchlorid, einem Hemmstoff der GSK-3 $\beta$ , in verschiedenen Konzentrationen. In mit Lithiumchlorid behandelten HEK-293- und Panc-1-Zellen konnte eine leicht, aber

nicht statistisch signifikant erhöhte Promotoraktivität durch Galektin-3 und -8 ermittelt werden. In H1299-Zellen hingegen zeigte sich keine Erhöhung der Promotoraktivität durch Galektine und eine tendenzielle Verringerung der Aktivität nach Behandlung der Zellen mit Lithiumchlorid. In der Zelllinie H1299 liegt möglicherweise eine veränderte Aktivität der Regulationsmechanismen der  $\beta$ -Catenin Stabilisierung vor. Im Western-Blot wurde die  $\beta$ -Catenin Menge kontrolliert und es zeigt sich eine Erhöhung der  $\beta$ -Catenin Menge in mit Lithiumchlorid behandelten H1299-Zellen (Abbildung 4.25).

Shimura et al. (2004) konnten in der Brustkrebszelllinie BT549 eine 5-fache Erhöhung der TOPflash-Reporteraktivität durch Galektin-3 nachweisen. Wurden die Zellen in Suspension gehalten, erhöhte sich die Reporteraktivität auf das 13-fache. In der Kolonkarzinomzelle HT29 ist durch eine APC-Mutation die Tcf/Lef-abhängige Reporteraktivität erhöht. Auch hier erhöht sich die Luziferaseaktivität durch den Einfluss von Galektin-3 dosisabhängig bis auf das 3,8-fache. Song et al. (2009) beschreiben für Kolonkarzinomzellen der Zelllinien RKO, LiM6, HM7 und LS174T Galektin-3-abhängige Veränderungen in der Tcf/Lef-abhängigen Reporteraktivität. Chung et al. (2015) konnten eine erhöhte Aktivität des TOPflash-Reporterkonstruktes in H1299-Zellen, welche in Suspensionskultur gehalten wurden, zeigen. Der erhöhten Promotoraktivität konnte durch *knockdown* von Galektin-3 entgegengewirkt werden.

Die von Shimura et al. (2004), Song et al. (2009) und Chung et al. (2015) publizierte Erhöhung der  $\beta$ -Catenin-abhängigen Tcf/Lef-induzierten Promotoraktivität durch Galektin-3 ist nicht auf die hier untersuchten HEK-293- und Panc-1-Zellen übertragbar bzw. in H1299-Zellen reproduzierbar. Für die untersuchten Zelllinien konnte kein Einfluss von Galektin-3 oder -8 auf den Wnt-Signalweg gezeigt werden. Möglicherweise beeinflusst die Interaktion zwischen Galektinen und Cateninen die Signaltransduktion anderer Signalwege, wie beispielsweise den MAPK-Signalweg. Durch Antikörperarray-Versuche sollte zukünftig analysiert werden, welcher Signalweg von der Interaktion betroffen sein könnte.

### 5.7 Ausblick

Der Wnt-Signalweg ist in einer Vielzahl von Tumoren aktiv.  $\beta$ -Catenin spielt einerseits eine zentrale Rolle in diesem Signalweg und ist andererseits Bestandteil der *Adherens Junctions*. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass  $\beta$ -Catenin sowie  $\gamma$ -Catenin mit Galektin-8 in Lungen- und Pankreaskarzinomzellen interagiert. Literaturdaten zeigen, dass Galektin-3 ein Bindungspartner von  $\beta$ -Catenin ist. In der vorliegenden Arbeit wurde auch  $\gamma$ -Catenin als Bindungspartner von Galektin-3 identifiziert. Welche Rolle  $\gamma$ -Catenin im Wnt-Signalweg einnimmt und welchen Einfluss die Interaktion von  $\gamma$ -Catenin mit Galektinen auf die Genregulation hat, gilt es in weiteren Studien zu klären. Es konnte für Galektin-1, -3, und -8 gezeigt werden, dass sie mit Proteinen der Ras-Familie interagieren. Weitere Versuche müssen klären, ob auch Galektin-1 Interaktionspartner der Catenine ist und welchen Einfluss diese Interaktion auf Catenin-abhängige Signalwege haben könnte. Galektin-3 und -8 führen zu keiner veränderten Aktivität des Wnt-Signalweges. Ob die neu identifizierte Interaktion zwischen Galektin-8 und  $\beta$ - sowie  $\gamma$ -Catenin Einfluss auf die Signaltransduktion anderer Signalwege hat, gilt es zukünftig zu untersuchen.

Galektine spielen eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung und -progression sowie bei der Metastasierung. Durch die intrazelluläre Interaktion von Galektinen mit verschiedenen Proteinen können Ras-abhängige und Catenin-abhängige Signalwege moduliert werden. Galektin-Inhibitoren könnten möglicherweise effektiv in der Krebstherapie eingesetzt werden, um spezifisch relevante Signalwege, die durch die Beteiligung von Galektinen aktiviert werden, zu hemmen.

## 6. Zusammenfassung

Galektine gehören zur Familie der Lektine und binden  $\beta$ -Galaktoside mit hoher Affinität. Galektine kommen sowohl intrazellulär, im Nukleus, im Cytoplasma und an der Zellmembran als auch extrazellulär vor. Sie besitzen je nach Lokalisation unterschiedliche Funktionen. Intrazellulär sind Galektine an Protein-Protein-Interaktionen und an der Beeinflussung verschiedener Signalwegen beteiligt. Extrazellulär spielen Galektine eine modulierende Rolle bei der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion. Galektine sind in der Regulation einer Vielzahl von zellulären Prozessen, wie dem Zellzyklus, der Zellproliferation, der Apoptose, Entzündungsprozesse, der malignen Transformation und der Metastasierung, involviert. Für Galektin-1, -3 und -8 konnte eine Interaktion mit Ras-Proteinen nachgewiesen werden, wodurch Ras-abhängige Signalwege aktiviert werden. In verschiedenen Zelllinien konnte für Galektin-3 eine Interaktion mit  $\beta$ -Catenin und eine veränderte Genregulation  $\beta$ -Catenin-abhängiger Gene gezeigt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte in verschiedenen Lungenkarzinomzelllinien eine Korrelation der zellulären Menge an Galektin-3 bzw. -8 mit der Menge an  $\gamma$ -Catenin, nicht jedoch mit der Menge an  $\beta$ -Catenin gezeigt werden. Durch Immunpräzipitationsstudien konnte erstmalig beschrieben werden, dass Galektin-8 in verschiedenen Pankreas- und Lungenzellkarzinomlinien mit  $\beta$ - und  $\gamma$ -Catenin interagiert. Auch konnte erstmals die Interaktion von Galektin-3 mit  $\gamma$ -Catenin gezeigt werden. Durch Interaktionsstudien, unter Verwendung von einer membran- und einer cytosolhaltigen Fraktion, konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Galektine und Catenine in der Zellmembranfraktion miteinander interagieren. Mittels Immunfluoreszenz konnte erstens eine Kernlokalisation von Galektin-3 und -8 sowie für  $\beta$ - und  $\gamma$ -Catenin experimentell belegt werden. Zweitens konnte die Kolo-kalisation der untersuchten Galektine und Catenine an der Zellmembran dargestellt werden. Mit Hilfe von Genreporterassays konnte kein Einfluss von Galektin-3 und -8 auf den Wnt-Signalweg gezeigt werden.

Galektin-8 wurde in dieser Arbeit erstmalig als Interaktionspartner von  $\beta$ - als auch  $\gamma$ -Catenin identifiziert sowie Galektin-3 als Interaktionspartner von  $\gamma$ -Catenin.

**7. Abstract**

Galectins belong to the family of lectins and bind to  $\beta$ -galactosides with high affinity. Galectins are located intracellularly within the nucleus, the cytosol and at the plasma membrane as well as extracellularly. Galectins carry out different functions depending on the localisation of the protein. Intracellular galectins are involved in protein-protein interactions and influence diverse signaling pathways. Extracellular galectins play a modulating role in cell-cell and cell-matrix interactions. Galectins regulate various cellular processes like the regulation of the cell cycle, cell proliferation, apoptosis, the inflammatory response, malignant transformation and metastasis. The interaction of galectin-1, -3, and -8 with Ras proteins has been proven, which leads to an activation of Ras-dependent signaling pathways. In several different cell lines the interaction of galectin-3 with  $\beta$ -catenin has been shown. Furthermore, galectin-3 might be involved in the modulation of  $\beta$ -catenin-dependent gene regulation.

In this present study it was shown that the amount of galectin-3 and -8 correlated with the amount of  $\gamma$ -catenin but not with the amount of  $\beta$ -catenin in various lung carcinoma cell lines. The present work provides novel evidence that galectin-8 binds to  $\beta$ - and  $\gamma$ -catenin in different lung and pancreatic carcinoma cell lines. Additionally, an interaction between galectin-3 and  $\gamma$ -catenin was detected for the first time. By performing protein interaction studies using membrane- and cytosol-containing protein fractions, it was shown that the investigated galectins and catenins interact in the membrane fraction with each other. Using immunofluorescence analyses, the colocalisation of the analysed galectins and catenins at the plasma membrane was verified. Additionally, a localisation of galectin-3 and -8 as well as  $\beta$ - and  $\gamma$ -catenin could be shown within the nucleus. Gene reporter assays revealed no influence of galectin-3 or -8 on Wnt signaling.

In this work galectin-8 has been identified as a novel interaction partner of  $\beta$ - as well as  $\gamma$ -catenin and galectin-3 was shown to interact with  $\gamma$ -catenin.

**8. Literaturverzeichnis**

- Barnard, S.-J.** (2015). Charakterisierung der Interaktion von K-Ras mit Galektin-8 und deren Einfluss auf die Signaltransduktion von Karzinomzellen. Biologische Dissertation, Universität Gießen.
- Barondes, S. H., Castronovo, V., Cooper, D. N., Cummings, R. D., Drickamer, K., Feizi, T., Gitt, M. A., Hirabayashi, J., Hughes, C., Kasai, K., Leffler, H., Liu, F.-T., Lotan, R., Mercurio, A. M., Monsigny, M., Pillai, S., Poirer, F., Raz, A., Rigby, P. W., Rini, J. M. & Wang, J. L.** (1994a). Galectins: A Family of Animal  $\beta$ -Galactoside-Binding Lectins. *Cell*, 76(4), 597-598.
- Barondes, S. H., Cooper, D. N., Gitt, M. A. & Leffler, H.** (1994b). Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(33), 20807-20810.
- Behrens, J., Jerchow, B.-A., Würtele, M., Grimm, J., Asbrand, C., Wirtz, R., Kühl, M., Wedlich, D. & Birchmeier, W.** (1998). Functional Interaction of an Axin Homolog, Conductin, with  $\beta$ -catenin, APC, and GSK3 $\beta$ . *Science*, 280(5363), 596-599.
- Bidon-Wagner, N. & Le Pennec, J.-P.** (2004). Human galectin-8 isoforms and cancer. *Glycoconjugate Journal*, 19(7-9), 557-563.
- Cavallaro, U. & Christofori, G.** (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nature Review Cancer*, 4(2), 118-132.
- Chambers, A. F., Groom, A. C. & MacDonald, I. C.** (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Reviews Cancer*, 2(8), 563-572.
- Chung, L.-Y., Tang, S.-J., Sun, G. H., Chou, T. Y., Yeh, T. S., Yu, S. L. & Sun, K. H.** (2012). Galectin-1 Promotes Lung Cancer Progression and Chemoresistance by Upregulating p38 MAPK, ERK, and Cyclooxygenase-2. *Clinical Cancer Research*, 18(15), 4037-4047.
- Chung, L.-Y., Tang, S.-J., Wu, Y.-C., Sun, G.-H., Liu, H.-Y. & Sun, K.-H.** (2015). Galectin-3 augments tumor initiating property and tumorigenicity of lung cancer through interaction with  $\beta$ -catenin. *Oncotarget*, 6(7), 4936-4952.
- Cooper, D. N.** (2002). Galectinomics: finding themes in complexity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1572(2-3), 209-231.
- Cooper, D. N. & Barondes, S. H.** (1990). Evidence for Export of a Muscle Lectin from Cytosol to Extracellular Matrix and for a Novel Secretory Mechanism. *The Journal of Cell Biology*, 110(5), 1681-1691.
- Du, Y.-X., Liu, Z.-W., You, L., Wu, W.-M. & Zhao, Y.-P.** (2016). Advances in understanding the molecular mechanism of pancreatic cancer metastasis. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*, 15(4), 361-370.
- Dumic, J., Dabelic, S. & Flögel, M.** (2006). Galectin-3: An open-ended story. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1760(4), 616-635.
- Elad-Sfadia, G., Haklai, R., Balan, E. & Kloog, Y.** (2004). Galectin-3 Augments K-Ras Activation and Triggers a Ras Signal That Attenuates ERK but Not Phosphoinositide 3-Kinase Activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(33), 34922-34930.
- Elola, M. T., Ferragut, F., Cárdenas Delgado, V. M., Nugnes, L. G., Gentilini, L., Laderach, D., Troncoso, M. F., Compagno, D., Wolfenstein-Todel, C. & Rabinovich, G. A.** (2014). Expression, localization and function of galectin-8, a tandem-repeat lectin, in human tumors. *Histology and Histopathology*, 29(9), 1093-1105.
- Fidler, I. J.** (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nature Reviews Cancer*, 3(6), 453-458.

- Gadgeel, S. M.** (2013). New Targets in Non-Small Cell Lung Cancer. *Current Oncology Reports*, 15(4), 411-423.
- Geiger, T. R. & Peeper, D. S.** (2009). Metastasis mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1796(2), 293-308.
- Giles, R. H., van Es, J. H. & Clevers, H.** (2003). Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1653(1), 1-24.
- Gupta, G. P. & Massagué, J.** (2006). Cancer Metastasis: Building a Framework. *Cell*, 127(4), 679-695.
- Hadari, Y. R., Arbel-Goren, R., Levy, Y., Amsterdam, A., Alon, R., Zakut, R. & Zick, Y.** (2000). Galectin-8 binding to integrins inhibits cell adhesion and induces apoptosis. *Journal of Cell Science*, 113 (13), 2385-2397.
- Hartsock, A. & Nelson, W. J.** (2008). Adherens and tight junctions: Structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778(3), 660-669.
- Heuberger, J. & Birchmeier, W.** (2010). Interplay of Cadherin-Mediated Cell Adhesion and Canonical Wnt Signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(2), a002915.
- Hoffman, P. C., Mauer, A. M. & Vokes, E. E.** (2000). Lung cancer. *The Lancet*, 355(9202), 479-485.
- Huang, C., Liu, S., Tong, X. & Fan, H.** (2018). Extracellular vesicles and ctDNA in lung cancer: biomarker sources and therapeutic applications. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 82(2), 171-183.
- Hughes, R. C.** (1997). The galectin family of mammalian carbohydrate-binding molecules. *Biochemical Society Transactions*, 25(4), 1194-1198.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E. & Forman, D.** (2011). Global Cancer Statistics. *CA – A Cancer Journal for Clinicians*, 61(2), 69-90.
- Johannes, L., Jacob, R. & Leffler, H.** (2018). Galectins at a glance. *Journal of Cell Science*, 131(9).
- Kobayashi, T., Shimura, T., Yajima, T., Kubo, N., Araki, K., Tsutsumi, S., Suzuki, H., Kuwano, H. & Raz, A.** (2011). Transient gene silencing of galectin-3 suppresses pancreatic cancer cell migration and invasion through degradation of  $\beta$ -catenin. *International Journal of Cancer*, 129(12), 2775-2786.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Lavra, L., Ulivieri, A., Rinaldo, C., Dominici, R., Volante, M., Luciani, E., Bartolazzi, A., Frasca, F., Soddu, S. & Sciacchitano, S.** (2009). Gal-3 is stimulated by gain-of-function p53 mutations and modulates chemoresistance in anaplastic thyroid carcinomas. *Journal of Pathology*, 218(1), 66-75.
- Leckband, D. E. & de Rooij, J.** (2014). Cadherin Adhesion and Mechanotransduction. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30, 291-315.
- Leffler, H.** (2001). Galectins Structure and Function – A Synopsis. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 33, 57-83.
- Leffler, H., Carlsson, S., Hedlund, M., Qian, Y. & Poirier, F.** (2004). Introduction to galectins. *Glycoconjugate Journal*, 19(7-9), 433-440.
- Levy, Y., Arbel-Goren, R., Hadari, Y. R., Eshhar, S., Ronen, D., Elhanany, E., Geiger, B. & Zick, Y.** (2001). Galectin-8 Functions as a Matricellular Modulator of Cell Adhesion. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(33), 31285-31295.

- Levy, Y., Ronen, D., Bershadsky, A. D. & Zick, Y.** (2003). Sustained Induction of ERK, Protein Kinase B, and p70 S6 Kinase Regulates Cell Spreading and Formation of F-actin Microspikes Upon Ligation of Integrins by Galectin-8, a Mammalian Lectin. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(16), 14533-14542.
- Lin, C.-I., Whang, E. E., Abramson, M. A., Donner, D. B., Bertagnolli, M. M., Moore, F. D. & Ruan, D. T.** (2009). Galectin-3 regulates apoptosis and doxorubicin chemoresistance in papillary thyroid cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379(2), 626-631.
- Liu, F.-T., Patterson, R. J. & Wang, J. L.** (2002). Intracellular functions of galectins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1572(2-3), 263-273.
- Liu, F.-T. & Rabinovich, G. A.** (2005). Galectins as modulators of tumour progression. *Nature Reviews Cancer*, 5(1), 29-41.
- Miller, J. R., Hocking, A. M., Brown, J. D. & Moon, R. T.** (1999). Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/ $\beta$ -catenin and Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  pathways. *Oncogene*, 18(55), 7860-7872.
- Miller, K. D., Siegel, R. L., Lin, C. C., Mariotto, A. B., Kramer, J. L., Rowland, J. H., Stein, K. D., Alteri, R. & Jemal, A.** (2016). Cancer Treatment and Survivorship Statistics, 2016. *CA – A Cancer Journal for Clinicians*, 66(4), 271-289.
- Newlaczyl, A. U. & Yu, L. G.** (2011). Galectin-3 – a jack-of-all-trades in cancer. *Cancer Letters*, 313(2), 123-128.
- Niessen, C. M., Leckband, D. & Yap, A. S.** (2011). Tissue organization by cadherin adhesion molecules: dynamic molecular and cellular mechanisms of morphogenetic regulation. *Physiological Reviews*, 91(2), 691-731.
- Oda, H. & Takeichi, M.** (2011). Evolution: Structural and functional diversity of cadherin at the adherens junction. *The Journal of Cell Biology*, 193(7), 1137-1146.
- Oyanadel, C., Holmes, C., Pardo, E., Retamal, C., Shaughnessy, R., Smith, P., Cortés, P., Bravo-Zehnder, M., Metz, C., Feuerhake, T., Romero, D., Roa, J. C., Montecinos, V., Soza, A. & González, A.** (2018). Galectin-8 induces partial epithelial-mesenchymal transition with invasive tumorigenic capabilities involving a FAK/EGFR/proteasome pathway in Madin-Darby canine kidney cells. *Molecular Biology of the Cell*, 29(5), 557-574.
- Paz, A., Haklai, R., Elad-Sfadia, G., Ballan, E. & Kloog, Y.** (2001). Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation. *Oncogene*, 20(51), 7486-7493.
- Polakis, P.** (2000). Wnt signaling and cancer. *Genes & Development*, 14(15), 1837-1851.
- Polireddy, K. & Chen, Q.** (2016). Cancer of the Pancreas: Molecular Pathways and Current Advancement in Treatment. *Journal of Cancer*, 7(11), 1497-1514.
- Reymond, N., d'Água, B. B. & Ridley, A. J.** (2013). Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nature Reviews Cancer*, 13(12), 858-870.
- Seguin, L. & Féral, C.** (2018). Personalized medicine: exploiting druggable vulnerabilities for KRAS-driven lung cancer. *Oncoscience*, 5(5-6), 124-125.
- Shalom-Feuerstein, R., Levy, R., Makovski, V., Raz, A. & Kloog, Y.** (2008). Galectin-3 regulates RasGRP4-mediated activation of N-Ras and H-Ras. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1783(6), 985-993.
- Shi, C., Hruban, R. H. & Klein, A. P.** (2009). Familial Pancreatic Cancer. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 133(3), 365-374.



- Shimamura, T., Sakamoto, M., Ino, Y., Shimada, K., Kosuge, T., Sato, Y., Tanaka, K., Sekihara, H. & Hirohashi, S.** (2002). Clinicopathological Significance of Galectin-3 Expression in Ductal Adenocarcinoma of the Pancreas. *Clinical Cancer Research*, 8(8), 2570-2575.
- Shimizu, K., Goldfarb, M., Suard, Y., Perucho, M., Li, Y., Kamata, T., Feramisco, J., Stavnezer, E., Fogh, J. & Wigler, M. H.** (1983). Three human transforming genes are related to the viral ras oncogenes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 80(8), 2112-2116.
- Shimura, T., Takenaka, Y., Fukumori, T., Tsutsumi, S., Okada, K., Hogan, V., Kikuchi, A., Kuwano, H. & Raz, A.** (2005). Implication of Galectin-3 in Wnt Signaling. *Cancer Research*, 65(9), 3535-3537.
- Shimura, T., Takenaka, Y., Tsutsumi, S., Hogan, V., Kikuchi, A. & Raz, A.** (2004). Galectin-3, a Novel Binding Partner of  $\beta$ -Catenin. *Cancer Research*, 64(18), 6363-6367.
- Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A.** (2016). Cancer Statistics, 2016. *CA – A Cancer Journal for Clinicians*, 66(1), 7-30.
- Song, S., Mazurek, N., Liu, C., Sun, Y., Ding, Q. Q., Liu, K., Hung, M.-C. & Bresalier, R. S.** (2009). Galectin-3 Mediates Nuclear  $\beta$ -Catenin Accumulation and Wnt Signaling in Human Colon Cancer Cells by Regulation of GSK-3 $\beta$  Activity. *Cancer Research*, 69(4), 1343-1349.
- Storti, P., Marchica, V. & Giuliani, N.** (2017). Role of Galectins in Multiple Myeloma. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12).
- Swope, D., Li, J. & Radice, G. L.** (2013). Beyond cell adhesion: The role of armadillo proteins in the heart. *Cellular Signalling*, 25(1), 93-100.
- Takenaka, Y., Fukumori, T., Yoshii, T., Oka, N., Inohara, H., Kim, H.-R., Bresalier, R. S. & Raz, A.** (2004). Nuclear Export of Phosphorylated Galectin-3 Regulates Its Antiapoptotic Activity in Response to Chemotherapeutic Drugs. *Molecular and Cellular Biology*, 24(10), 4395-4406.
- van den Brûle, F., Califice, S. & Castronovo, V.** (2004). Expression of galectins in cancer: A critical review. *Glycoconjugate Journal*, 19(7-9), 537-542.
- Vite, A., Li, J. & Radice, G. L.** (2015). New functions for alpha-catenins in health and disease: from cancer to heart regeneration. *Cell and Tissue Research*, 360(3), 773-783.
- Wang, Y., Nangia-Makker, P., Balan, V., Hogan, V. & Raz, A.** (2010). Calpain activation through galectin-3 inhibition sensitizes prostate cancer cells to cisplatin treatment. *Cell Death and Disease*, 1, e101.
- Wodarz, A. & Nusse, R.** (1998). Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 14, 59-88.
- Wongkham, S., Junking, M., Wongkham, C., Sripa, B., Chur-In, S. & Araki, N.** (2009). Suppression of galectin-3 expression enhances apoptosis and chemosensitivity in liver fluke-associated cholangiocarcinoma. *Cancer Science*, 100(11), 2077-2084.
- Xi, Y. & Chen, Y.** (2014). Wnt signaling pathway: Implications for therapy in lung cancer and bone metastasis. *Cancer Letters*, 353(1), 8-16.
- Yang, R.-Y., Rabinovich, G. A. & Liu, F.-T.** (2008). Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 10, e17.

- Zago, G., Muller, M., van den Heuvel, M. & Baas, P.** (2016). New targeted treatments for non-small-cell lung cancer – role of nivolumab. *Biologics: Targets and Therapy*, 10, 103-117.
- Zhang, Q., Zeng, L., Chen, Y., Lian, G., Qian, C., Chen, S., Li, J. & Huang, K.** (2016). Pancreatic Cancer Epidemiology, Detection, and Management. *Gastroenterology Research and Practice*, 2016, 8962321.
- Zheng, J., Lu, W., Wang, C., Xing, Y., Chen, X. & Ai, Z.** (2017). Galectin-3 induced by hypoxia promotes cell migration in thyroid cancer cells. *Oncotarget*, 8(60), 101475-101488.
- Zick, Y., Eisenstein, M., Goren, R. A., Hadari, Y. R., Levy, Y. & Ronen, D.** (2004). Role of galectin-8 as a modulator of cell adhesion and cell growth. *Glycoconjugate Journal*, 19(7-9), 517-526.

**9. Konferenzbeitrag**

**Amanda Zmyslony, Tara Procida, Christopher Meinohl, Klaudia Giehl, Andre Menke** (2018). Intracellular binding of Galectin-8 to  $\beta$ - and  $\gamma$ -Catenin in adenocarcinoma cells. DGZ – International Meeting of the German Society for Cell Biology, 2018.

**10. Ehrenwörtliche Erklärung****Erklärung zur Dissertation**

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

**11. Danksagung**

Hiermit bedanke ich mich bei allen Personen, die zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Andre Menke für die wissenschaftliche Betreuung und unermüdliche Unterstützung bei der Erstellung meiner Doktorarbeit.

Vielen Dank an Frau Professorin Klaudia Giehl für die kompetenten Antworten zu allen während des Laboralltags aufgetretenen Fragen.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe. Wir haben nicht nur exzellent zusammengearbeitet, sondern sind auch Freunde geworden.

Bei meiner Familie und meinen Freunden bedanke ich mich für die grenzenlose Unterstützung und den stetigen Zuspruch während der gesamten Zeit meiner Doktorarbeit und meines Studiums.